

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSU-
CHUNGEN DER LYMPHOZYTENKINETIK IM
BLUT BEI ZWEI HÄMATOLOGISCH GE-
SUNDEN PATIENTEN UND BEI FÜNF
PATIENTEN MIT CHRONISCHER
LYMPHATISCHER LEUKÄMIE

Walter Past

1961

Aus der I. Medizinischen Abteilung
des Städtischen Krankenhauses München - Schwabing

Chefarzt: Prof. Dr. H. Begemann

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN DER LYMPHOZYTEN-
KINETIK IM BLUT BEI ZWEI HÄMATOLOGISCH GESUNDEN
PATIENTEN UND BEI FÜNF PATIENTEN MIT CHRONISCHER
LYMPHATISCHER LEUKÄMIE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Walter Past

aus

München

München

1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Begemann
Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 4. 1981



DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
<u>EINLEITUNG</u>	1
<u>PATIENTEN UND METHODE</u>	4
1. Patienten	4
2. Methode	9
a) In-vitro-Markierung mit ^3H -TdR	11
b) In-vivio-Markierung mit ^3H -TdR	12
3. Begriffsbestimmung	15
<u>ERGEBNISSE</u>	17
1. Kurvenanalyse der hämatologisch normalen Patienten	17
2. Kurvenanalyse der CLL-Patienten	22
<u>DISKUSSION</u>	30
1. Voraussetzungen	30
2. Berechnung und Diskussion der umsatzkinetischen Parameter	32
Patient Glio 2	32
Glio 1	34
CLL 2	35
CLL 7	36
CLL 8	37
CLL 10	38
CLL 11	39
3. Wachstumsfraktion	40
4. Methodische Störfaktoren bezüglich Konstanz der Kernvolumina und	41
5. Strahlenbelastung	43
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	49
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	51

EINLEITUNG

Bereits 1847 erkannte Virchow den Zusammenhang zwischen Vergrößerung von Milz und Lymphknoten einerseits und der darin und im Blut befindlichen großen Anzahl kleiner mononukleärer Zellen andererseits.

Das anatomische Bild der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) wird von Galton (21) als eine progressive Akkumulation reifer Lymphozyten beschrieben, welche die Gesamtmasse dieser Zellen enorm erhöht. Die Lymphozyten sammeln sich in Organen und Geweben, welche sie normalerweise durchströmen:

Milz, Lymphknoten, Knochenmark, Blut.

Ziel hämatologischer Forschung bleibt, zu erfassen, in welcher Weise bei der chronisch lymphatischen Leukämie das folgende Modell der kinetischen Struktur des normalen lymphatischen Zellsystems gestört ist.

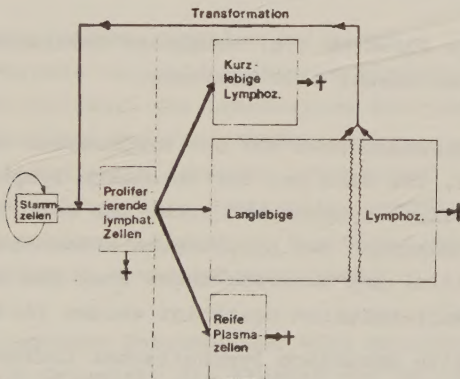


Abb. I Allgemeines kinetisches Modell des normalen lymphatischen Zellsystems (aus Trepel, F. 1975) (50). Die Kästchen symbolisieren die Zellpools, die Pfeile den Fluß aus einem Pool in den anderen, die Kreuze den Zelltod. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen proliferationsfähigen (links) und ruhenden Zellen (rechts).

Die Lymphozytenkinetik beschreibt nach Trepel (50) "die dynamischen Vorgänge der Vermehrung und Elimination sowie den Gestalts- und Ortswechsel von Zellen in Zellsystemen".

Nach Bremer und Fliedner (8/19) finden sich etwa 2 % aller Lymphozyten im Blut, ca 70 % in den lymphatischen Organen, 10 % im Knochenmark und 10 bis 20 % in anderen Geweben. Zwischen diesen "pools" findet im Normalfall ein reger Austausch statt.

Unter physiologischen Bedingungen verschwinden - um das Gleichgewicht zu erhalten - ständig Lymphozyten aus dem Zellsystem. Dies geschieht durch Transformation z.B. in Immunoblasten, welche wiederum zu Plasmazellen werden, oder durch Austritt in den Gastrointestinaltrakt, oder durch Zelltod im lymphatischen Gewebe. Dies trifft zum überwiegenden Teil für normale B-Lymphotzyten zu. Die primär immunkompetenten B-Lymphozyten sind nach Sprent (48) kurzlebig und rezirkulieren kaum.

Rezirkulierende Lymphozyten sind in erster Linie kleine Zellen und gehören der langlebigen Population an (22). Dabei überwiegen die T-Zellen.

Die bereits 1885 von Flemming (18) vermutete Rezirkulation von Zellen wurde 1959 von Gowans (22) bewiesen.

Während sich beim Gesunden etwa 80% der Lymphozyten an der Rezirkulation beteiligen, ist dies bei der chronisch lymphatischen Leukämie für die meisten Lymphozyten nicht der Fall (8). Dies konnte anhand von Messungen des Lymphozyten-Ausstoßes über den Ductus thoracicus (3/4) und Untersuchungen über die Lymphozytenmigration mittels Retransfusion bestätigt werden (8/44).

Die Mehrzahl der Fälle chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) betrifft die B-Lymphozyten (9). Nach Salmon (42) kann die CLL als eine Erkrankung primitiver B-Lymphozyten bezeichnet werden. T - Zell-Lymphome sind beschrieben, kommen aber sehr selten vor. Zur Methode der Differenzierung zwischen T- und B-Lymphozyten darf auf einschlägige Literatur verwiesen werden (2/28/50).

Während beim hämatologisch Gesunden ein Gleichgewicht besteht zwischen Lymphozytenproduktion und -elimination, leidet der Patient mit CLL an einer langsam expandierenden lymphatischen Tumor-

zell-Population. Man kann die CLL geradezu als ein Modell für eine langsam wachsende Tumorzell-Population betrachten.

Die vorliegende Arbeit soll dies bestätigen.

Gleichwohl ist bekannt, daß im Verlauf dieser Erkrankung Phasen eines "steady state" auftreten, das heißt, es kommt zu einem vorübergehenden Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und -abbau.

Nach Begemann (1970) ist die chronisch lymphatische Leukämie "eine generalisierte Erkrankung des lymphatischen Gewebes, die in ihrer klassischen Verlaufsform mit einer Vermehrung der Lymphozyten im peripheren Blut und einer abnormen Wucherung lymphatischer Zellen in den Lymphgeweben und anderen Organen einhergeht. Die Erkrankung ist zwar bösartig, die Prognose aber individuell sehr verschieden."

Welcher pathologische Mechanismus schließlich verantwortlich ist für die Akkumulation von offensichtlich nicht funktionsfähigen Lymphozyten (13), bleibt zu diskutieren.

Die gängigen Theorien seien angeführt:

- Entgleisung normaler Zellklone -
- Normale Zellbildung bei vermindertem Abbau -
- Unfähigkeit der Lymphozyten zur Transformation -
- Gestörte Emigrationsfähigkeit -
- Akkumulation normaler Lymphozyten in einer Umgebung in welcher ihre Reaktivität gestört ist -
- Monoklonale Aberration B-artiger Lymphozyten mit veränderten Membraneigenschaften.

In der vorliegenden Untersuchung wird versucht, im Vergleich zu hämatologisch Gesunden, die Kinetik von Zellumsatz und Produktion bei der chronisch lymphatischen Leukämie quantitativ zu erfassen.

Als ein mögliches Kriterium für die Progredienz der Erkrankung ist die Größe der Wachstumsfraktion dargestellt.

Abschließend soll die Methode, hinsichtlich Strahlentoxizität und Konstanz der Zellkern-Volumina einer kritischen Wertung unterzogen werden.

PATIENTEN UND METHODE

1. Patienten

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an zwei hämatologisch gesunden und an fünf Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie, jenseits des Fortpflanzungsalters, unter Überwachung eines Strahlenschutzbeauftragten, durchgeführt. Nach eingehender Aufklärung über die Kautelen der Untersuchung fanden sich die Patienten zu diesem für sie unbedenklichen Versuch bereit.

Patient Glio 2 (Normalpatient)

Bei der 65-jährigen Patientin bestand seit 15 Jahren eine Herzinsuffizienz sowie seit ca. 10 Jahren eine mittelschwere Hypertonie. An Medikamenten hatte sie Briserin, Lanitop, Fludilat und Kalium Duriles bekommen. Diese Medikamente haben nach pharmakologischen Kenntnissen keinen Einfluß auf das lymphatische System. Die stationäre Aufnahme erfolgte wegen apoplektischem Insult mit rechtsseitiger Hemiparese. Im Computertomogramm wurde ein inoperabler Hirntumor (Glioblastom) festgestellt.

Patient Glio 1 (Normalpatient)

Bei der zum Zeitpunkt der Untersuchung 54-jährigen Patientin war zwei Jahre vorher ein temporomedial gelegener, bis zum Hirnstamm reichender Tumor (Glioblastom) teilweise entfernt worden. Danach bestand weiterhin Aphasie, Inkontinenz, rechtseitige Hemiparese. Keine medikamentöse Behandlung während der Untersuchung. Die Untersuchung wurde mit dem Einverständnis des Ehemannes durchgeführt.

Anzumerken ist, daß bei dieser Patientin während der umsatzkinetischen Untersuchung ein leichter fieberhafter Infekt unklarer Genese aufgetreten war.

Patient CLL 2

Zum Zeitpunkt der ersten Umsatzbestimmung war der Patient 67 Jahre alt. Die Erstdiagnose wurde bereits 13 Jahre früher anhand einer Leukozytose und einer dezenten Milzvergrößerung gestellt. Vor 7 1/4 Jahren wurde eine fortbestehende Leukozytose mit 11.000 Lymphozyten beschrieben. Eine spez. Therapie war nicht nötig. Anamnestisch ist von einem seit 20 Jahren bestehendem bronchitischen Syndrom zu berichten. Zur Krankenhauseinweisung kam es wegen zunehmender Leistungsminderung und kurzzeitiger Temperaturerhöhung.

Am Tag der stationären Aufnahme sahen wir den adipösen Patienten in wenig reduziertem Allgemeinzustand, Milzvergrößerung 10 cm unter dem Rippenbogen sowie Lymphknotenvergrößerung bis 1,5 cm in allen Regionen. Die Röntgenaufnahme zeigte Verdichtungen im Hilusgebiet.

Zwei Jahre nach der zellkinetischen Untersuchung war der Patient bei einer Kontrolluntersuchung, abgesehen von den Beschwerden seitens der chron. Bronchitis und der bestehenden Herzinsuffizienz, wohlauf. Es zeigte sich eine langsame Progredienz der Leukozytose auf 26800 bei 70% Lymphozyten gegenüber dem Erstbefund von 21600/59%. Das Knochenmark zeigte eine Infiltration von 80% durch kleine reife Lymphozyten, bei der Erstuntersuchung sah man 59%.

Patient CLL 7

Aus der Vorgeschichte der bei Beginn der Untersuchung 72-jährigen Patientin war eine lange bestehende Anämiesymptomatik zu erfahren. Zunehmende Leistungsinsuffizienz führte zur stationären Aufnahme. Aufgefallen war ein Tumor im linken Oberbauch sowie Lymphknotenvergrößerung in der linken Leiste.

Wir sahen eine massive Leukozytose von 330000/ μ l, wobei es sich fast zu 100% um Lymphozyten handelte. Das Knochenmark war zu 95% von Ly infiltriert. Während der stationären Vorbereitung zur Milzbestrahlung wurde die umsatzkinetische Untersuchung durchgeführt. Medikamentös wurde zunächst nicht behandelt.

Nach Abschluß unserer Untersuchung begann man mit der Milzbestrahlung (440 RMD Gesamtdosis in 25 Sitzungen). Sie bewirkte

einen deutlichen Rückgang der Milz- und Lymphknotenschwellung sowie eine Lymphozytenreduktion auf 25000.

Bei einer Kontrolluntersuchung 3 Monate nach Behandlung wurde eine Teilremission der CLL festgestellt.

Patient CLL 8

Die Anamnese des zum Zeitpunkt der Untersuchung 70-jährigen Patienten ergab einen deutlichen Gewichtsverlust seit ca. 1 Jahr, Abgeschlagenheit und Kurzatmigkeit. Bei der Aufnahmeuntersuchung war die Milz im Inspirium um ca. 5 cm unter dem Rippenbogen vergrößert, weiche, indolente, bis bohngroße Lymphknoten nur inguinal tastbar. Im peripheren Blutaussstrich sahen wir 350.000 Leukozyten (ausschließlich Lymphozyten), das Knochenmark war zu 95% von kleinen lymphatischen Zellen infiltriert.

Während der stationären Vorbereitung zur extrakorporalen Blutbestrahlung wurde die Zellmarkierung durchgeführt.

Patient CLL 10

Die Diagnose wurde bei dem 58-jährigen Patienten ebenfalls während der stationären Untersuchung gestellt. Seit einem Jahr war eine langsam zunehmende Halsschwellung aufgefallen, außerdem berichtete der Patient über eine Gewichtsabnahme von 3 kg in 1/2 Jahr, sowie über allgemeine Leistungsschwäche. Aus der Vorgeschichte werden Appendektomie, Hepatitis, Mittelfußamputation wegen Erfrierung vermerkt. Bei der körperlichen Untersuchung finden sich bis kastaniengroße Lymphknoten in allen Regionen, das Mediastinum scheint röntgenologisch nicht verbreitert, die Milz reicht bei Inspiration bis an den Nabel. Das Knochenmark ist nahezu vollständig von Ly infiltriert, im peripheren Blut werden 530.000 Ly gezählt. Vor Beginn der therapeutischen Milzbestrahlung (650 RMD in 25 Sitzungen) wurde die ³H-TdR-Markierung durchgeführt.

Patient CLL 11

Zum Zeitpunkt unserer Untersuchung war die Patientin 73 Jahre alt. Bei der stationären Aufnahme berichtete sie über eine rapide

Verschlechterung ihres Wohlbefindens seit etwa 3 Monaten. Bei zunehmendem Bauchumfang hatte sie von 62 kg auf 58,3 kg Gewicht abgenommen und klagte über Kurzatmigkeit, Schwindelanfälle, häufige Erkältungen und allgemeine Schwäche.

Bei der anämischen Patientin in schlechtem Allgemeinzustand war eine bis 18 cm unter dem Rippenbogen massiv vergrößerte Milz sowie eine deutlich vergrößerte Leber tastbar.

Lymphknoten waren in allen Regionen indolent, verschieblich, bis zu Kirschgröße vergrößert tastbar.

Im peripheren Blutausschlag sah man 1.000.000 Lymphozyten/ μ l.

Therapeutisch wurde vom 20. bis 65. Tag unserer Untersuchung eine Milzbestrahlung (450 RMD Gesamtdosis in 32 Sitzungen) durchgeführt. Daneben wurde bei dieser Patientin vom 24. bis 55. Tag der Umsatzbestimmung eine zytostatische Behandlung mit Chlorambucil in einer Tagesdosis von 5 mg und im Anschluß daran ein weiterer Behandlungsversuch mit 20 mg Fluocortolone/Tag gemacht.

Eine Besserung der Erkrankung war mit diesen Maßnahmen nicht zu erreichen. 8 Monate nach Diagnosestellung verstarb die Patientin an einer Pneumonie.

Eine Gegenüberstellung der wichtigsten klinischen Daten für die sieben Versuchspersonen findet sich in Tabelle I in der Reihenfolge ihrer Blutlymphozytenzahl und der Schwere der Erkrankung. Die Diagnose - chronisch lymphatische Leukämie - wurde bei allen CLL-Patienten auf Grund der bekannten Kriterien wie Blutbild, Zellmorphologie, Lymphknotenhistologie und Knochenmarksbefund gestellt (2).

Ausdruck zunehmender Knochenmarksinfiltration ist die Anämie und Thrombozytopenie. Die Hypogammaglobulinämie korreliert mit der gestörten B-Zell - Funktion, ein Zusammenhang mit der Überlebenserwartung besteht jedoch nicht (50).

Tabelle I

Allgemeine klinische Daten:

Patienten	Geschlecht	Alter Jahre	Größe cm	Gewicht kg	Krankheits- zeichen	Milz cm unter Ri.Bogen	Therapie	Lymphknoten
Glio 2	w	65	158	65	-	-	-	-
Glio 1	w	54	163	56	-	-	-	-
CLL 2	m	67	165	82,3	13 Jahre	10	keine	multiple
CLL 7	w	72	168	55,7	5 Jahre	7	Milzbestr.li.	Leiste
CLL 8	m	70	172	70	1 Jahr	5	ECIB	inguinal
CLL 10	m	58	169	77,3	1 bis 2 J.	12	Milzbestr. alle Reg.	
CLL 11	w	73	156	53	3 Monate	18	Milzbestr. multiple	
							+ Leukeran	
							+ Ultralan	

Hämatologische Werte

Patienten	Hb g%	Hkt %	Erythro- z. Mill/ μ l	Leukozyt. pro μ l	Lymphozyt. pro μ l	Knochenmark- infiltr.	Thrombo- zyt./ μ l	Gamma- glob./g%
Glio 2	12,0	38	4,2	7.000	2.310	-	169.000	1,2
Glio 1	13,0	39	4,3	7.100	2.343	-	154.000	1,2
CLL 2	14,3	48	4,3	28.600	16.300	57 %	290.000	1,3
CLL 7	9,8	30	3,2	300.000	300.000	95 %	15.000	0,47
CLL 8	10,8	32	3,5	350.000	350.000	95 %	127.000	0,31
CLL 10	16,7	52	4,9	530.000	530.000	95 %	123.000	0,38
CLL 11	7,6	23	3,5	1.000.000	1.000.000	95 %	24.000	0,83

2. Methode

Durch die Verwendung radioaktiver Isotope zur Zellmarkierung ist ein wesentlicher Einblick in das Phänomen der Blutzellbildung und der Blutzellkinetik möglich geworden.

Bereits 1952 beschrieb Osgood (36) die Entwicklung der Lymphozytenzahl bei CLL mit Hilfe der p^{32} -Markierung.

In dieser Frühphase der Zellmarkierungsära wurde mit einer Einzelinjektion lediglich eine Stichprobe neugebildeter Lymphozyten markiert.

Mit dem Problem der durchschnittlichen Überlebenszeit von CLL-Lymphozyten beschäftigte sich Hamilton (26). Er verwendete zur Markierung C^{14} Adenin.

Spivak u. Perry (47/37) beschreiben die Markierung mit Cr^{51} und die dabei auftretenden Fehlerquellen sowie die hohe Strahlenanfälligkeit der Zellen auf Cr^{51} .

Auch die Markierung mit 3H -Cytidin erschien uns ungeeignet, da die 3H -Cytidin-Markierung eine instabile Markierung ist. Dies zeigt sich 24 Stunden nach Autotransfusion in einer deutlichen Markierung über dem Zytoplasma neben der Kernmarkierung.

Die hier angewandte und beschriebene Methode mit dem radioaktiv markierten Nukleosid Thymidin (3H -TdR) wurde von Lajtha et al (32) beschrieben.

Als besonders geeignet zur Autoradiographie gilt 3H -TdR aus verschiedenen Gründen:

Der natürliche Kernbaustein Thymidin wird den proliferierenden Zellen während der DNS-Synthese eingebaut, bleibt stabil im Zellkern und wird gleichermaßen an die Tochterzellen weitergegeben - geringe Reichweite und somit nur schwache background-Bildung - eine Halbwertszeit von 12 Jahren bei einer Zerfallsrate von 0,016 %/die - geringfügige Strahlenenergie von 0,018 MeV.

Die Gabe von 3H -TdR als einmalige flash-dosis, wie von Zimmermann et al (51) an 11 Patienten mit CLL durchgeführt und beschrieben, erlaubt nur ungenaue Aussagen über Neubildungsraten und Umsatzzeiten.

Clarkson et al (11) arbeitete bereits mit einer 8-tägigen ^3H -TdR-Infusion bei akuten Myelosen und berechnete anhand der Markierungsindices die Umsatzzeiten der Lymphozyten. Die Begriffe werden später noch erläutert.

Wie bei Trepel (50) ausführlich beschrieben, ermöglicht das kontinuierliche Angebot von ^3H -TdR in einem definierten Zeitintervall bei CLL-Patienten Aufschluß über wesentliche pathophysiologische Parameter wie Lymphozytenneubildung und Bestimmung von Neubildungs- und Umsatzraten.

Eine Beeinträchtigung der Versuchsperson durch Strahlenbelastung konnte bisher in keinem Fall nachgewiesen werden. Inwieweit eine mögliche Schädigung des Lymphozytenkerns durch Radiotoxizität des ^3H -TdR die Auswertung unserer Untersuchung stören kann, wird in der Diskussion besprochen. Auf diesen möglichen Nachteil der ^3H -RdR-Markierung, in Abhängigkeit von der Dosis, wird bereits in einer Arbeit von Greenberg (23) hingewiesen.

2 a) In-vitro-Markierung mit ^3H -TdR

Ein geringer Teil der Lymphozyten besitzt die Fähigkeit, unabhängig von der DNS-Synthesephase und nachfolgender Zellteilung, ^3H -TdR aufzunehmen. Dieser Anteil an Zellen, welche während einer in-vitro-Inkubation exogenes Thymidin inkorporieren, kann, nach Untersuchungen von Lopez-Sandoval (33), als Index für die Anzahl der leukämischen Zellen im zirkulierenden Blut gelten.

Es wurden daher vor der in-vivo-Dauermarkierung von jedem Patienten in-vitro-Präparate angefertigt:

10 ml heparinisiertes Venenblut werden mit ACDH-Plasmagel versetzt. Nach Absedimentieren der Erythrozyten wird der Überstand abgehebert und zu je 2 ml Suspension 1 μCi pro ml ^3H -TdR gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wird die Suspension ca 4 Min bei 1000 U/min zentrifugiert und das Zellkonzentrat gleichmäßig ausgestrichen. Nach Fixation in Methylalkohol werden die Ausstriche in gleicher Weise wie die in-vivo-Präparate autoradiographiert.

Bei der Bestimmung des Markierungsindex ergeben sich die Werte für DNS-synthetisierende lymphatische Zellen im Blut wie in Tabelle II aufgeführt.

Tabelle II

DNS-synthetisierende lymphatische Zellen im Blut

Patient	Prozentsatz	Anzahl / μl Blut
Glio 2	0,13 %	3
Glio 1	0,25 %	6
C11 2	0,03 %	5
C11 7	0,04 %	118
C11 8	0,02 %	70
C11 10	0,03 %	159
C11 11	0,05 %	490

2 b) In-vivo-Markierung mit $^3\text{H-TdR}$

Als Markierungsisotop wurde, wie bei der in-vitro-Markierung, der mit dem Betastrahler Tritium markierte DNS-Baustein Thymidin-desoxyribosid mit der spezifischen Aktivität 5 Ci/mMol ($^3\text{H-TdR}$) verwendet (Radiochemical Centre Amersham, Great Britain).

Bei dem Patienten Glio 2 gaben wir mit Hilfe einer Dosierpumpe eine kontinuierliche Tagesdosis von 0,1 μCi / g Körpergewicht (KG) über drei Tage, was bei einem Körpergewicht von 65 kg einer Gesamtdosis von 19,5 mCi entspricht.

Patient Glio 1 erhielt eine kontinuierliche Tagesdosis von 0,1 $\mu\text{Ci/gKG}$ über 7 Tage, sodaß bei 56 kg KG insgesamt 39,2 mCi infundiert wurden.

Bei dem Patienten Cll 2 infundierten wir eine Tagesdosis von 0,12 $\mu\text{Ci/gKG}$ über insgesamt 3 Tage, dies entspricht einer Gesamtdosis von 29,5 mCi. Die Infusion des $^3\text{H-TdR}$ erfolgte über einen Subclaviakatheter. Um eine Okklusion des Katheters zu verhindern, wurde im Nebenschluß physiologische Kochsalzlösung zugegeben.

Auf gleiche Weise infundierten wir bei der Patientin Cll 7 eine Tagesdosis von 0,12 $\mu\text{Ci/gKG}$ über 3 Tage. Hier wurde eine initiale Injektion von 0,03 $\mu\text{Ci/gKG}$ intravenös verabreicht. Dies ergibt bei einem KG von 56 kg eine Gesamtdosis v. 20,16 mCi.

Bei dem Patienten Cll 10 verfahren wir ebenso. Eine initiale Injektion von 0,03 $\mu\text{Ci/gKG}$ und 0,12 μCi Tagesdosis pro kg KG über 3 Tage, dies entspricht bei einem KG von 77 kg einer Gesamtdosis von 30,03 mCi.

Bei dem Patienten Cll 8 boten wir die Markierung in Form von 4 Injektionen intravenös a 0,025 $\mu\text{Ci/gKG}$ im Abstand von 6 Stunden über insgesamt 3 Tage an, was einer Gesamtdosis von 21,0 mCi bei einem KG von 70 kg entspricht.

Patient C11 11 erhielt in einer Dauerinfusion von Tag 1 bis 5 eine kontinuierliche Tagesdosis von $0,1 \mu\text{Ci/gKG}$. Im Anschluß daran von Tag 6 bis 9 dreimal täglich subcutane Injektionen a $0,033 \mu\text{Ci/gKG}$ im Abstand von 8 Stunden. Dies entspricht einer Gesamtdosis von $52,2 \text{ mCi}$ bei $58,3 \text{ kg KG}$.

Wir entnahmen am ersten Tag nach Beginn der Isotopenzufuhr Blutproben im 2 - 3 Stundenabstand, bis zum zehnten Tag in 8-stündigem Abstand und schließlich in größeren Abständen. Mit Hilfe des Coulter-Counter wurde die Anzahl der Leukozyten pro mm^3 in der jeweiligen Probe bestimmt. Daneben wurde für jede Probe das Differentialblutbild angefertigt.

Für die autoradiographische Untersuchung wurden Leukozyten-Ausstriche in folgender Weise angefertigt:

Aus dem Blut werden nach Zugabe von EDTA-Plasmagel die Erythrozyten absedimentiert und der leukozytenreiche Überstand abpipettiert. Die Leukozytensuspension wird mit 240 g 5 Min zentrifugiert. Aus dem Zellsediment werden Präparate ausgestrichen, luftgetrocknet und mit absolutem Methylalkohol fixiert, 1 Stunde gewässert und autoradiographiert. Das heißt, die so hergestellten Präparate wurden, um die radioaktive Markierung sichtbar zu machen, mit Kodak - AR 10 stripping film beschichtet, in lichtdichten Bakelitkästchen zusammen mit CaCl_2 als Feuchtigkeitsabsorber, wie unten angegeben bei 4°C exponiert, anschließend entwickelt und mit gepufferter 2%iger Giemsalösung ($\text{pH } 5,75$) gefärbt.

Die Expositionszeit wurde, nachdem in Probesets die Zeit bis zur optimalen Markierung ermittelt war, bei Glio 1 auf 140 Tage, bei Glio 2 auf 350 Tage, bei C11 2 auf 203 Tage, bei C11 7 auf 243 Tage, bei C11 8 auf 273 Tage, bei C11 10 auf 241 Tage, bei C11 11 auf 300 Tage, festgelegt.

Der Einfluß der Expositionszeit auf Kern- und Zytoplasmamarkierung wird in einer Arbeit von Schick et al beschrieben (45).

Unter dem Mikroskop wurden die Ausstriche auf übliche Weise zytologisch differenziert und ausgewertet. Während der gesamten Beobachtungszeit wurde mit dem Okularmikrometer der Kerndurchmesser der markierten Lymphozyten gemessen und die durchschnittliche

Kernfläche für alle Untersuchungszeitpunkte berechnet.

Pro Termin wurden 3000 - 5000 Zellen ausgezählt.

Der Prozentsatz an markierten Zellen ergibt den Markierungsindex (MI). Bei den ersten 500 Zellen eines jeden Präparates werteten wir die Kornzahl getrennt nach Kern- und Zytoplasmamarkierung aus.

Die Markierungsintensität (DKZ) wurde durch Auszählen der Silberkornzahl über dem Zellkern ermittelt.

Da eine Hintergrundmarkierung (background) die Anzahl der Körnchen etwas verfälscht, wurde dieser "background" an Leerpräparaten, welche vor Applikation des ^3H -TdR hergestellt wurden, festgestellt. Bei Auswertung der aktivitätsfreien Kontrollpräparate wurden keine Zellen gefunden, die mehr als 9 Körnchen über dem Kern und Zytoplasma aufwiesen.

Bei der Bestimmung des Markierungsindex und der Markierungsintensität wurden nur solche Werte verwendet, welche über dieser "background-Grenze" von 9 Körnchen lagen.

3. Begriffsbestimmung

In der folgenden Analyse der Lymphozytenkinetik bei zwei hämatologisch Gesunden und fünf Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie werden Begriffe verwendet, welche vorab definiert werden sollen.

a) Begriffe der Produktions- und Umsatzkinetik

Anstiegsrate:	Zunahme des Markierungsindex in % / Tag
Einstromrate:	Einstrom neugebildeter Lymphozyten ins Blut pro Tag (Anzahl/ μ l/d) = Neubildungsrate
Verdoppelungszeit:	Zeitspanne, in der sich bei exponentiellem Wachstum die Lymphozytenzahl im Blut verdoppelt.
Akkumulationsrate:	Der aus der Verdoppelungszeit errechnete Zellzuwachs in %/Tag ($\frac{\ln 2}{T} \times 100$)
Umsatzrate:	= Anstiegsrate unter "steady state"-Bedingungen
Umsatzzeit:	Zeitspanne, in der eine durch die Umsatzrate definierte Zellpopulation erneuert wird
Verweildauer:	Zeitspanne zwischen erstmaligem Eintritt und endgültigem Verlassen eines Zellkompartiments (durchschnittliche Verweildauer = $\frac{T_{1/2}}{\ln 2}$)
Lebenszeit:	Die durchschnittliche Verweildauer entspricht dem unteren Grenzwert der durchschnittlichen Lebenszeit. In diesem Sinn sind die Begriffe "kurzlebig" bzw. "langlebig" zu verstehen.

b) Proliferationskinetische Begriffe

Vorläuferkom- Summe der proliferierenden Zellen, auf die die
partiment: Ruhezellproduktion für das jeweilige Ruhezell-
kompartiment zurückzuführen ist.

Zellzykluszeit: (=Generationszeit) Zeitspanne zwischen zwei auf-
einanderfolgende Zellteilungen.

Transitzeit im Summe der der Produktion von Ruhezellen vorge-
Vorläuferkom- schalteten Zykluszeiten.
partiment:

Bluttransit- Durchgangszeit durch den zirkulierenden Blutlympho-
zeit: zytenspeicher
durchschnittliche Bluttransitzeit = $\frac{T/2}{\ln 2}$

steady state: unter physiologischen Bedingungen ist die Anzahl
der Zellen, welche in ein Gewebe einwandern
(by migration) und durch Teilung neugebildet wer-
den, gleich der Zahl, welche abwandern bzw. ab-
sterben (15).

ERGEBNISSE

1. Kurvenanalyse der hämatologisch normalen Patienten

Anhand des zeitlichen Verlaufs der Markierungsindexkurve (MI), der durchschnittlichen Kernfläche und der semilogarithmischen Abfallkurve des MI, wollen wir unsere umsatzkinetische Untersuchung mit der jeweiligen Kurvenbeschreibung beginnen.

Man kann davon ausgehen, daß die markierten Lymphozyten ausschließlich das Verhalten der neugebildeten Lymphozyten anzeigen. Das bedeutet, das der Zustrom an markierten Zellen der Neubildungsrate der Blutlymphozyten während der Untersuchung entspricht. Das Erscheinen der ersten markierten Lymphozyten im Blut nach Beginn der $^3\text{H-TdR}$ -Zufuhr entspricht der Zeitspanne aus den Minimalwerten der prämitotischen Ruhephase, der Mitosephase der Vorläuferzelle sowie der Ausschwemmzeit der neugebildeten Tochterzelle (46/30).

Besteht ein Gleichgewicht zwischen der Neubildung von Lymphozyten und dem Abströmen dieser Zellen aus dem Blut b.z.w. deren Absterben ("steady state"), so entspricht die gemessene Anstiegsrate der Umsatzrate.

Patient Glio 2 (Abb. 1/2/3): Die aus dem steilsten Stück der Anstiegsphase ermittelte Anstiegsrate beträgt 1,0 % / Tag. Nach Absetzen der $^3\text{H-TdR}$ -Infusion nimmt der Markierungsindex (MI) noch 2 Tage, bei gleichzeitiger rascher Kornzahlverminderung, zu. Dies kann als Hinweis gewertet werden, daß die durchschnittliche Transitzeit im Vorläuferkompartiment der Blutlymphozyten mindestens 48 Stunden beträgt.

Unterteilt nach Kornzahl wird die Halbwertszeit der niedrigmittel- und hochmarkierten Lymphozyten in ihrer jeweiligen Kornklasse in einer semilogarithmischen Abfallkurve dargestellt (Abb. 3).

Der Gesamtmarkierungsindex nimmt zunächst mit einer Halbwertszeit von 4,4 Tagen, dann, nach einem 4 bis 5-tägigen Intervall, mit einer Halbwertszeit ($T_{1/2}$) von 6,5 Tagen ab.

Etwa am Ende der vierten Woche schließt sich eine sehr langsame Komponente mit einer $T_{1/2}$ von etwa 320 Tagen an.

Bei Anheben der Kornzahlschwelle auf 40 Körner (Abb. 3) verkürzen sich die Halbwertszeiten der drei Komponenten auf 3,2 Tage bzw. auf 250 Tage.

Die Zellen mit ≈ 80 Körnern verschwinden mit Halbwertszeiten von 2,2 und 2,6 Tagen.

Die dritte Komponente ist aus statistischen Gründen nicht beurteilbar.

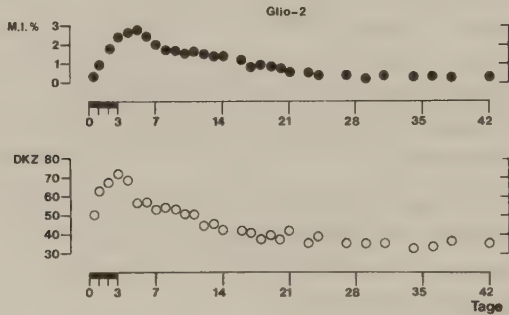


Abb. 1

oben: Zeitliche Änderung des Markierungsindex (MI)
für die gesamten Lymphozyten
unten: Zeitliche Änderung der Markierungsintensität
d.h. durchschnittliche Körnchenzahl (DKZ)
bei Patient Glio 2
bei 3-tägiger Infusion (schwarzer Querbalken links
unten)

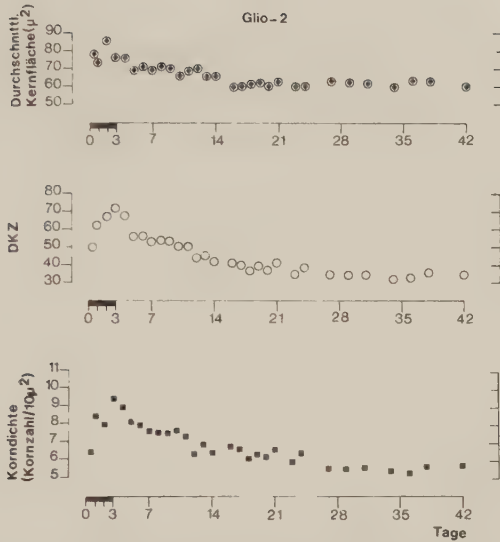


Abb. 2

oben: Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Kernfläche in μ^2
 unten: Zeitlicher Verlauf der Korndichte, d.h. Anzahl der Körner pro $10\mu^2$ bei Patient Glios 2

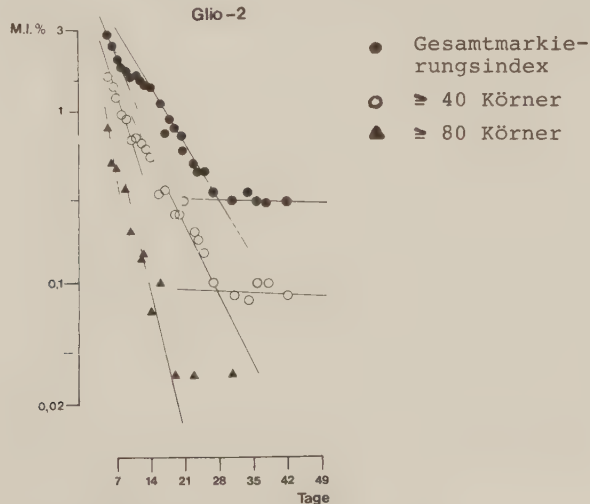


Abb. 3

Semilogarithmische Abfallkurve (Halbwertszeit des Verschwindens) der markierten Lymphozyten nach Kornklassen bei Pat. Glios 2

Patient Glio 1 (Abb. 4/5): Im Gegensatz zu Glio 2 lassen sich aus der Anstiegsphase der Markierungsindex (MI) - Kurve zwei Komponenten ableiten, deren Werte etwa 3 % / Tag und 0,95 % / Tag betragen. Nach Absetzen des $^3\text{H-TdR}$ nimmt der MI noch einen Tag geringfügig zu.

Demnach überwiegt der Einstrom den Abstrom markierter Zellen nur für diesen kurzen Zeitraum.

Auf die Transitzeit durch das Vorläuferkompartiment wird weiter unten eingegangen.

Die Abfallphase des MI ist wiederum in mehrere Komponenten zerlegbar: Der MI zeigt initial einen steilen Abfall mit einer $T_{1/2}$ von 2,8 Tagen; nach einer Schulter von etwa 4 Tagen Länge folgt die zweite Komponente mit einer $T_{1/2}$ von 5,8 Tagen, der sich die dritte flache Komponente mit einer $T_{1/2}$ von etwa 320 Tagen anschließt.

Bei einer Kornzahlschwelle von ≥ 40 Körnern verkürzen sich die Halbwertszeiten auf 2,4 Tage, 5,4 bzw. etwa 300 Tage.

Der MI - Verlauf mit ≥ 80 Körnern läßt nur 2 Komponenten erkennen, deren Halbwertszeiten 1,6 und angenähert 300 Tage betragen.

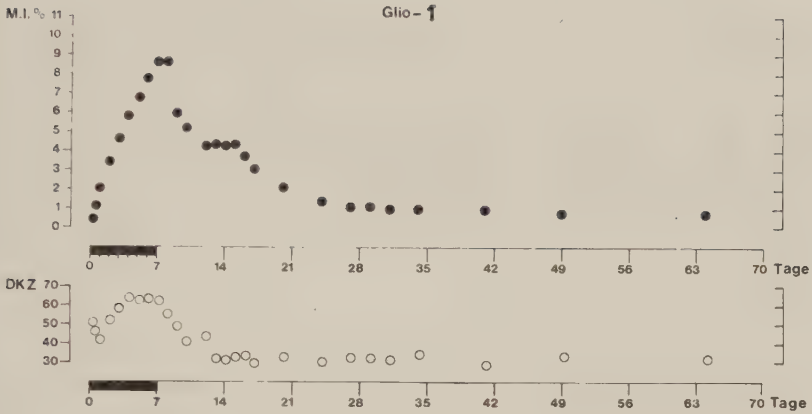


Abb. 4

oben: Zeitliche Änderung des Markierungsindex (MI)
 unten: Zeitliche Änderung der Markierungsintensität d.h.
 durchschnittliche Körnchenzahl (DKZ) bei Pat. Glio 1.
 7 Tage kontinuierliche Dauerinfusion (schwarzer
 Querbalken links unten)

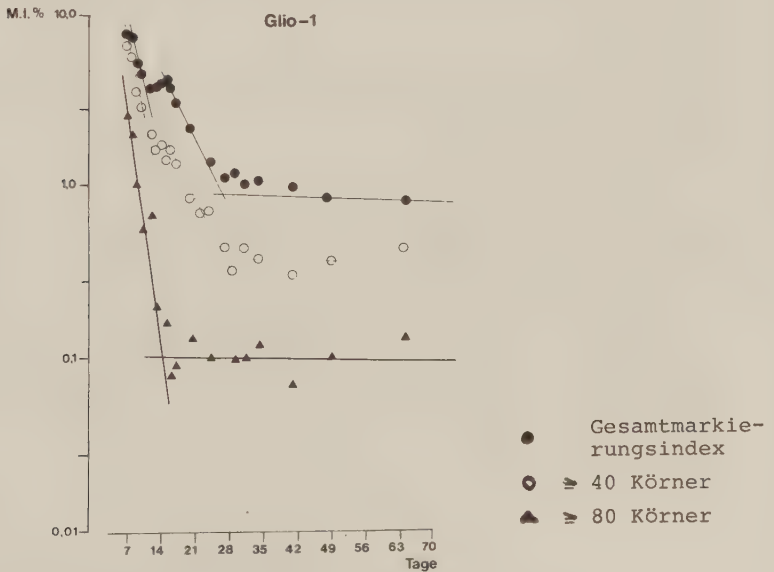


Abb. 5

Semilogarithmische Abfallkurve (Halbwertszeit des Verschwindens) der markierten Lymphozyten nach Kornklassen bei Pat. Glio 1

2. Kurven-Analyse der Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie

Nach Darstellung normaler umsatzkinetischer Parameter bei zwei hämatologisch Gesunden, folgt nun in der Reihenfolge der peripheren Lymphozytenzahl die Kurvenbeschreibung der CLL-Patienten. Die Interpretation folgt im Diskussionsteil.

CLL 2 (Abb. 6/7)

Die MI - Kurve steigt verzögert und erst vom 3. Tag ab mit einer Rate von 0,95 % / Tag an. Die Kurve setzt den Anstieg mit gleicher Rate bis zum Ende des 5. Tages fort, flacht anschließend ab und erreicht den Maximalwert von 3,6 % am Tag 7.

Offensichtlich liegt hier eine Ausschwemmungsverzögerung von 2 Tagen vor.

Aufgrund des Intervalls zwischen Markierungsende und Erreichen des maximalen MI minus 2 Tage Ausschwemmungsverzögerung wird die durchschnittliche Transitzeit im Vorläuferkompartiment auf 2 Tage geschätzt.

Für diese Annahme sprechen die durchschnittliche Körnchenzahl (DKZ) - und Korndichte - Kurven, die zwischen Tag 5 und 7 den stärksten Abfall zeigen.

Der MI fällt vom 8. Tag an mit einer $T_{1/2}$ von 3,4 Tagen (entsprechend einer durchschnittlichen Verweildauer von 4,9 Tagen) und nach einer zwischenzeitlichen Schulterbildung von 3 bis 4 Tagen erneut mit einer $T_{1/2}$ von 7,8 Tagen (entsprechend einer durchschnittlichen Verweildauer von 8,4 Tagen) ab. Daran schließt sich eine von der Horizontalen nur minimal abweichende Abfallkomponente mit einer möglichen $T_{1/2}$ von etwa 1200 Tagen an.

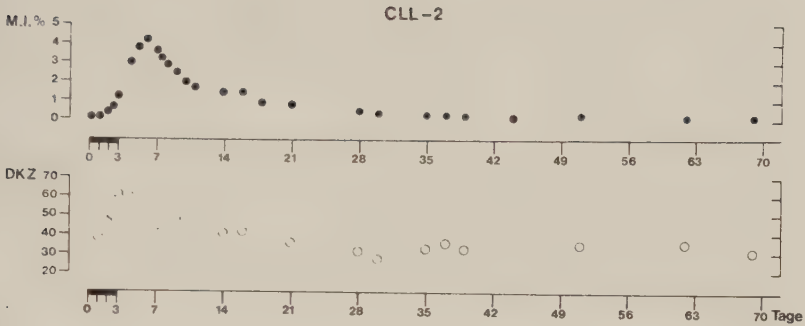


Abb. 6

Zeitliche Änderung des Markierungsindex (MI) und der Markierungsintensität (DKZ) bei Patient CLL 2
 Infusionsdauer 3 Tage (schwarzer Querbalken links unten)

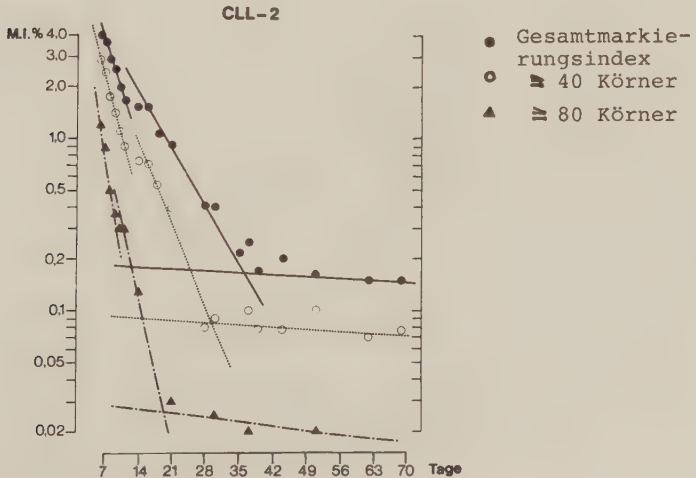


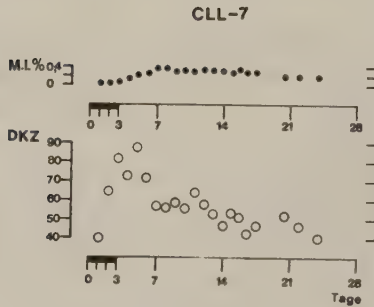
Abb. 7

Semilogarithmische Abfallkurve des MI nach Kornklassen bei Patient CLL 2

Cl1 7 (Abb. 8/11)

Bei dieser Patientin beträgt die aus der Anstiegsphase der MI-Kurve ermittelte Anstiegsrate 0,07 % / Tag. Der Maximalwert des MI wird erst 4 Tage nach Ende der ^3H -TdR-Infusion erreicht, was wiederum auf einen verzögerten Einstrom neugebildeter Zellen hinweist.

Da die DKZ ihr Maximum 2 Tage nach Infusionsende erreicht, ist anzunehmen, daß der verzögerte Einstrom markierter Zellen ziemlich genau 2 Tage beträgt. Dem Maximalwert von 87 Körnern folgt eine rasche Verminderung der DKZ innerhalb der nächsten beiden Tage auf 57 Körner, der sich ein allmählicher weiterer Abfall anschließt.

Abb. 8

Zeitliche Änderung des Markierungsindex (MI)
und der Markierungsintensität (DKZ)
bei Patient CLL 7

CLL 8 (Abb. 9/10)

Der Markierungsindex steigt mit einer Rate von 0,33 % / Tag bis etwa 2 Tage nach Absetzen der ^3H -TdR-Infusion auf 1,35 % an, flacht dann zunehmend ab und erreicht sein Maximum von 1,65 % nach weiteren 5 Tagen.

Der sich annähernd linear fortsetzende Anstieg des MI über das Infusionsende hinaus spricht für eine Vorläuferkompartiment-Transitzeit von etwa 48 Stunden.

Der sich anschließende geringe Weiteranstieg des MI für 5 Tage zeigt auch in diesem Fall das Vorliegen eines verzögerten Einstroms neugebildeter Zellen. Danach zeigt die Indexkurve bei semi-logarithmischer Darstellung (Abb. 10) zwei Abfallkomponenten mit Halbwertszeiten von 12,8 und 379 Tagen.

Da die Korndichte vom Tag 10 bis zum Ende der Beobachtungsdauer praktisch gleichbleibt, ist ein strahlentoxisch bedingtes Ausscheiden von Zellen weitgehend ausgeschlossen. Damit entfällt die Notwendigkeit, die Verweildauer der Zellen anhand der niedrigmarkierten Lymphozyten zu bestimmen.

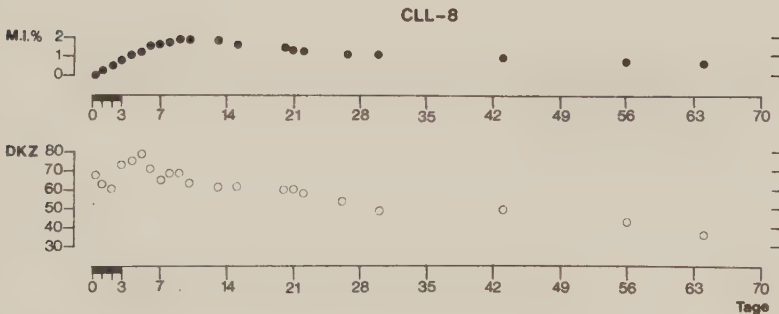


Abb. 9

Zeitliche Änderung des Markierungsindex (MI)
und der Markierungsintensität (DKZ)
bei Patient CLL 8

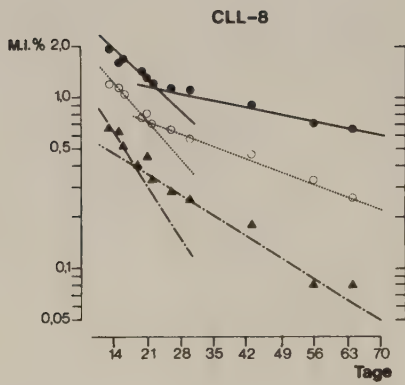


Abb. 10

Semilogarithmische Darstellung der MI-Abfallkurve
nach Kornklassen
bei Patient CLL 8

CLL 10 (Abb. 11)

In diesem Fall wurde die Anstiegsrate mit 0,17 % / Tag ermittelt. Nach Absetzen von ^3H -TdR setzt sich der Anstieg des Markierungsindex noch einen Tag mit der gleichen Steilheit fort, flacht dann ab und erreicht seinen Maximalwert von etwa 1 % erst gegen Ende der dritten Woche.

Anschließend zeigt die MI - Kurve einen sehr langsamen Abfall, der einer Halbwertszeit von etwa 228 Tagen entspricht.

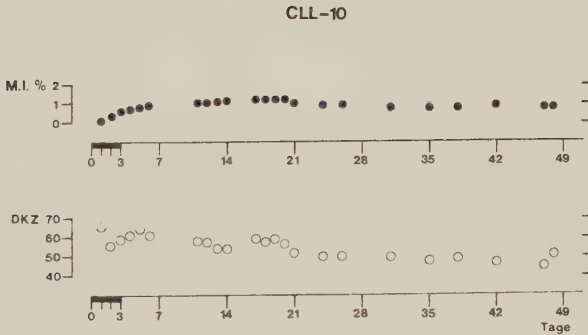


Abb. 11

Zeitliche Änderung des Markierungsindex (MI)
und der Markierungsintensität (DKZ)
bei Patient CLL 10

CLL 11 (Abb. 12/13)

Die Anstiegsrate des Markierungsindex beträgt 0,15 %/Tag. Der M.I. steigt nach Ende der $^3\text{H-TdR}$ - Gabe noch ein bis zwei Tage mit der gleichen Rate an. Dann flacht der Anstieg der Kurve ab und geht in ein Plateau über, das bis zum Ende der Beobachtungszeit von 70 Tagen anhält.

Die Indexkurve läßt auf einen deutlich verzögerten Einstrom neugebildeter Lymphozyten schließen, weil der Maximalwert erst etwa 20 Tage nach Beendigung der $^3\text{H-TdR}$ - Zufuhr erreicht wird.

Aufgrund des verzögerten Einstroms markierter Zellen ist hier die Transitzeit im Vorläuferkompartiment nicht beurteilbar.

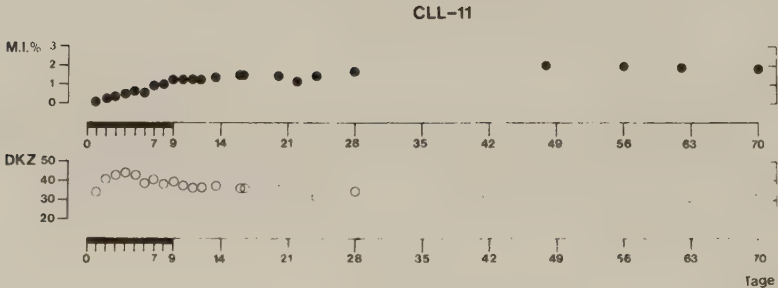


Abb. 12

Zeitliche Änderung des Markierungsindex (MI) der gesamten Lymphozyten und der Markierungsintensität (DKZ) bei Patient CLL 11
 Infusionsdauer 9 Tage (schwarzer Querbalken)

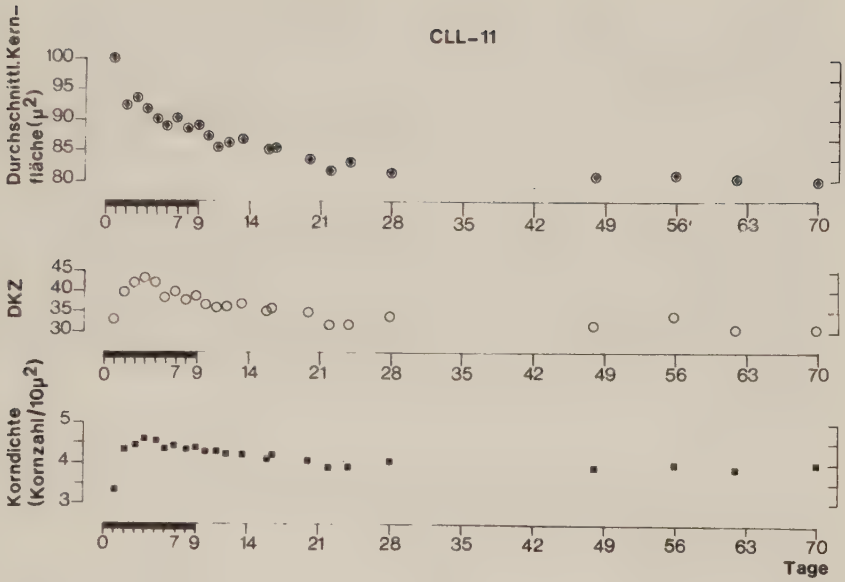


Abb. 13

oben: Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Kernfläche
 unten: Zeitlicher Verlauf der Korndichte, d.h. Anzahl der
 Körner pro $10 \mu^2$
 bei Patient CLL 11

DISKUSSION

1. Voraussetzungen

Unter folgenden Voraussetzungen wird die vorliegende Untersuchung diskutiert:

- a) Alle markierten Lymphozyten sind neugebildete Ruhezellen, welche durch Teilung aus markierten Vorläuferzellen hervorgegangen sind.
Eine Ausnahme bilden die DNS-synthetisierenden Blutlymphozyten, die unter dem Kapitel "in-vitro-Markierung" gesondert erfaßt wurden.
- b) Eine zytotoxische Beeinträchtigung der Zelle durch ^3H -Thymidin in der verwendeten Dosierung kann aufgrund spezieller Untersuchungen vernachlässigt werden.
- c) Eine Reutilisation von ^3H -TdR während der Infusion spielt für die Auswertung keine Rolle, da sie das gleiche bewirkt wie die exogene Zufuhr. Auch nach Absetzen der Infusion spielt die Reutilisation von ^3H -Thymidin-markierten DNS-Fragmenten keine Rolle.
- d) Für den Zeitraum unserer Untersuchung findet eine meßbare Veränderung der Zellproduktion nicht statt. Wir können also von einem "steady state" im Sinne eines Fließgleichgewichtes ausgehen.
- ad b) Bei den von Haas und Fliedner (24/20) durchgeführten Untersuchungen an Ratten mit einer 12-fachen der hier verwendeten Dosis / kg KG wurde keine Schädigung der Zellentwicklung festgestellt. Wir können somit davon ausgehen, daß durch die hier verwendeten Dosen kein Schaden am Organismus verursacht wird.
- ad c) Wie Feinendegen (16) anhand ^3H -TdR und Jod-Markierung nachweisen konnte, ist die Reutilisation von ^3H -Thymidin in den

lymphatischen Organen, im Vergleich zum Knochenmark sehr gering. Andererseits spielt das Knochenmark aufgrund der geringen Zahl proliferierender Zellen gegenüber den lymphatischen Organen vermutlich keine große Rolle was die Lymphozytenneuproduktion betrifft.

Wir nehmen daher an, daß die Lymphozyten, nach Absetzen der Isotopenzufuhr, ihre Markierung nur über die Vorläuferzellen erhalten.

Während der Isotopenzufuhr hat eine Reutilisation, im Vergleich zum exogenen Angebot, keine Bedeutung, da während der Dauermarkierung ohnehin jede in die DNS-Phase eintretende Zelle markiert wird.

2. Berechnung und Diskussion umsatzkinetischer Parameter

Unter den genannten Voraussetzungen wird die Lymphozytenkinetik der einzelnen Versuchspersonen besprochen. Die dabei verwendeten Begriffe sind auf S. 15 definiert.

Grundlage der Untersuchung ist das Verhalten der markierten Lymphozyten im Untersuchungszeitraum.

Die durch Analyse der Ein- und Ausstrombewegungen bei CLL-Patienten gewonnenen Daten werden denen der hämatologisch gesunden Versuchspersonen gegenübergestellt.

Der Anstieg der Markierungsindex - Kurve ist Ausdruck eines ständigen Einstroms neugebildeter Zellen in das Blut. Das Maß für diesen Zustrom ist die Anstiegsrate.

Am Verschwinden der markierten Zellen aus der Blutbahn, dargestellt an den semilogarithmischen Halbwertszeit-Kurven, lassen sich Lymphozytenpopulationen unterschiedlicher durchschnittlicher Lebensdauer nachweisen. Wir können eine rasch umgesetzte, d.h. "kurzlebige" und eine sehr langsam umgesetzte, "langlebige" Lymphozytenpopulation unterscheiden.

Dabei kommen nach Literaturangaben (44/50) beim Gesunden auf die kurzlebige Population 5 - 22 %, auf die langlebige 78 - 95 %.

Die Veränderung der durchschnittlichen Kernfläche sowie der Korndichte bzw. der Markierungsintensität im Zellkern, kann Aufschluß geben über eine mögliche Kernkondensation, Zellschädigung durch ^3H -TdR und die Vorläuferkompartiment-Transitzeit.

Bei Patient Glio 2 (Normalperson) nehmen, wie Abb. 2 zeigt, innerhalb der ersten zwei Tage nach ^3H -TdR-Zufuhr sowohl die durchschnittliche Kernfläche und die durchschnittliche Körnchenzahl (DKZ), als auch die Korndichte markierter Zellen rasch ab. Das wird damit erklärt, daß aus dem unter ^3H -TdR - Zufuhr markierten Vorläuferkompartiment noch etwa 2,5 Tage niedrig markierte Zellen einströmen.

Unter diesem Aspekt gesehen wäre die $T_{1/2}$ von 4,4 Tagen der ersten Komponente des Markierungsindex überschätzt.

Andererseits ist eine Verkürzung der Verweildauer hochmarkierter

Zellen durch Radiotoxizität nicht völlig auszuschließen, was die Tendenz zur Unterschätzung der Halbwertszeit mit sich bringen würde.

Inwieweit sich beide Effekte gegenseitig aufheben, ist nicht zu entscheiden.

Die vor allem bei der Gesamtmarkierungsindex-Kurve deutlich erkennbare Schulter zwischen der ersten und zweiten Komponente ist nicht eindeutig erklärbar. Als Erklärung kommen vor allem die folgenden zwei Möglichkeiten in Betracht:

Einstrom aus einem Vorläuferkompartiment mit einer Transitzeit von mehr als 2,5 Tagen oder Einstrom von Zellen, die zwar überwiegend innerhalb der ersten 5 bis 6 Tage gebildet, jedoch verzögert angeschwemmt werden.

Wie auf Seite 28 dargelegt, wird im vorliegenden Material der Verlauf des Markierungsindex durch Reutilisation nicht beeinflusst.

Da radiotoxische Effekte bei schwach markierten Zellen am wenigsten zu erwarten sind, wird die Lebenszeit der Lymphozyten anhand des Verhaltens niedrig markierter Zellen (10 - 39 Körner) geschätzt.

Aus dem Indexverlauf dieser Kornklasse lassen sich nur zwei eindeutige Komponenten abgrenzen: eine steile mit einer $T_{1/2}$ von 6 Tagen und eine sehr flache mit einer $T_{1/2}$ von 420 Tagen (Abb. 3). Daraus resultieren Umsatzzeiten von 8,7 bzw. 606 Tagen.

Die Umsatzzeit der langlebigen Lymphozyten kann auch auf andere Weise geschätzt werden:

Die dritte Komponente der Gesamtmarkierungsindex-Kurve wird auf einen Zeitpunkt extrapoliert, der der Summe aus Infusionsdauer und mutmaßlicher Transitzeit durch das Vorläuferkompartiment entspricht.

Bei Annahme einer durchschnittlichen Transitzeit von 2,5 Tagen erhält man einen extrapolierten Indexwert von 0,35 %. Aus dem Quotienten von $\frac{0,35 \%}{5,5 \text{ Tg}}$ ergibt sich dann eine durchschnittliche Umsatzzeit langlebiger Lymphozyten von 1430 Tagen (3,9 Jahre). (Umsatzzeit 606 bzw. 1430 Tage, Umsatzrate 0,165 % / Tag bzw. 0,07 % / Tag).

Aufgrund der vorliegenden Schätzwerte werden Durchschnittswerte

von 0,118 % / Tag und 1020 Tagen festgelegt.

Populationsanalyse:

Der Anteil kurz- und langlebiger Zellen innerhalb der Blutlymphozytenpopulation kann anhand der Anstiegsrate und der genannten Verweilzeiten geschätzt werden.

Aus der Gesamtanstiegsrate von 1 % / Tag und einer Umsatzrate langlebiger Zellen von 0,118 % / Tag ergibt sich für die rasch umgesetzte Population eine relative Einstromrate von 0,882 % / Tag.

Geht man von einer umsatzkinetisch homogenen Population kurzlebiger Zellen mit einer durchschnittlichen Umsatzzeit von 8,7 Tagen aus, dann beläuft sich der Anteil dieser Zellen an der Gesamtpopulation auf 7,7 % (0,882 % / Tag $\times$ 8,7 Tage).

Betrüge dagegen bei gleicher Prämisse die durchschnittliche Verweildauer nur 6,5 Tage, reduzierte sich der Anteil kurzlebiger Zellen auf 5,6 %.

Die Masse der Lymphozyten mit einem Anteil von 92,3 % bzw. 94,4 % wird von der langlebigen Population gestellt.

Glio 1 (Abb. 4/5)

Ebenso wie bei Glio 2 wurde die flache Abfallkomponente des Markierungsindex auf zwei Arten ermittelt. Anhand der niedrig markierten Zellen ergab sich eine $T_{1/2}$ von 320 Tagen (Abb. 5). Diesem Wert entspricht eine durchschnittliche Verweildauer von 476 Tagen und eine mittlere Umsatzrate von 0,21 % / Tag.

Ausgehend von einem Explorationswert von 0,93 % am Tag 9,5 (7 Tage Infusionsdauer plus mutmaßliche Vorläuferkompartiment-Transitzeit von wiederum 2,5 Tagen) ergibt sich eine Umsatzrate von 0,098 % / Tag und eine durchschnittliche Umsatzzeit langlebiger Lymphozyten von 1020 Tagen (2,8 Jahre).

Das Mittel aus den angegebenen Werten beträgt 749 Tage bzw. 0,134 % / Tag.

Bei den kurzlebigen Lymphozyten lassen sich im Gegensatz zu Glio 2 zwei Halbwertszeiten ermitteln, eine erste von ungefähr 2,8 Tagen und eine zweite, abgeleitet von der MI-Kurve der Kornklassen 10 bis 39, von 5,8 Tagen. Sie entsprechen durchschnittlichen Verweilzeiten von 4,0 bzw. 8,3 Tagen.

Der Anteil beider kurzlebiger Populationen an der Gesamtpopulation wird aus den mittleren Verweilzeiten und den oben genannten Anstiegsraten wie folgt geschätzt:

$$1) (3 \% - 0,95 \%) \times d^{-1} \times 4 d = 8,2 \%$$

$$2) (0,95 \% - 0,134 \%) \times d^{-1} \times 8,3 d = 6,8 \%$$

Somit macht die Population der kurzlebigen Lymphozyten insgesamt etwa 15 % aus. Komplementär entfallen auf die langlebige Population 85 % der Lymphozyten.

Der im Vergleich zu Glio 2 um einen Tag früher einsetzende Abfall der MI-Kurve wird nicht dahingehend gedeutet, daß die Transitzeit im Vorläuferkompartiment aller Lymphozyten nur einen Tag beträgt.

Zwar ist wahrscheinlich, daß der hohe Anteil an besonders rasch umgesetzten kurzlebigen Lymphozyten von einem Vorläuferkompartiment mit besonders kurzen Generationszeiten von 8 - 10 Stunden stammt.

Andererseits kann der bei Glio 2 angenommene Wert von 2,5 Tagen hier ebenfalls vorliegen. Dafür spricht der an den ersten drei Tagen nach Beendigung der $^3\text{H-TdR}$ - Zufuhr zu beobachtende steile Abfall der durchschnittlichen Körnchenzahl (DKZ) um etwa 40 %, der nicht nur durch Ausscheiden hochmarkierter kurzlebiger, sondern auch durch Einstrom zunehmend niedrig markierter Zellen aus einem Vorläuferkompartiment mit Generationszeiten von etwa 20 Stunden erklärbar ist.

Für die Beurteilung von Glio 1 ist wesentlich, daß die Patientin während der $^3\text{H-TdR}$ -Infusion einen leichten fieberhaften Infekt durchmachte.

Die sehr kurzlebige Lymphozytenpopulation mit einer Anstiegsrate von 2,05 % / Tag, einer T 1/2 von 2,8 Tagen und einer mutmaßlichen Vorläuferkompartiment-Transitzeit von etwa einem Tag dürfte Ausdruck der vermehrten Immunstimulation sein.

Die bei Cll 2 (Abb. 7) ermittelte, nahezu horizontale Abfallkomponente des MI mit der geschätzten T/2 von 1200 Tagen könnte Ausdruck einer sehr langsam umgesetzten Zellpopulation (Umsatzzeit von etwa 4,8 Jahren) oder einer Verdünnung der Konzentration durch

Akkumulation unmarkierter Zellen sein.

Nimmt man an, es handelt sich um Zellumsatz, ergibt sich eine rechnerisch aus der Anstiegsrate wie folgt ermittelte Halbwertszeit von 1330 Tagen:

$$\text{Relative Einstromrate} = 0,26 \% / 5 \text{ d} = 0,052 \% \times \text{d}^{-1}$$

$$\text{durchschnittliche Umsatzzeit} = 100 \% / 0,052 \% \times \text{d}^{-1} = 1920 \text{ d}$$

$$\text{Halbwertszeit} = 1920 \text{ d} \times \ln 2 = 1330 \text{ d}$$

Unter der Annahme, es läge eine Verdünnung durch exponentielles Wachstum vor, ergibt sich aufgrund anamnesticcher Daten eine Halbwertszeit von 4560 Tagen:

Aus dem Anstieg der Blutlymphozytenzahl von 11000 auf 16300 innerhalb von 7,23 Jahren ergäbe sich eine Verdoppelungszeit von 4560 Tagen (12,5 Jahre). Dieser Wert müßte der Halbwertszeit der Verdünnung markierter Zellen entsprechen.

Die nach der Umsatzhypothese errechnete Halbwertszeit liegt im gleichen Bereich wie die graphisch ermittelte $T_{1/2}$.

Ob sich das System zum Untersuchungszeitpunkt allerdings im strikten steady state befand, läßt sich aufgrund der limitierten Daten nicht eindeutig entscheiden.

Der Anteil kurzlebiger Zellen an der Gesamtpopulation beträgt maximal 7,5 % ($0,9 \% \times \text{d}^{-1} \times 8,4 \text{ d}$).

Die Tatsache, daß bei C11 7 (Abb. 8) der MI nach Abschluß des verzögerten Einstroms noch zwei Tage mit der gleichen Rate wie zuvor ansteigt, spricht für eine Transitzeit im Vorläuferkompartiment von zwei Tagen.

Aus dem MI - Anstieg von 0,2 % auf 0,4 % und dem gleichzeitigen DKZ - Abfall von 87 auf 57 Körnern zwischen dem 5. und 7. Tag läßt sich eine durchschnittliche Anzahl von zwei Sukzedanteilungen im Vorläuferkompartiment mit einer Generationszeit von etwa 24 Stunden auf folgende Weise ableiten:

$$0,2 \% \text{ mit } 87 \text{ Körnern (Basiswert am Tag 5)} + 0,1 \% \text{ mit } \frac{87}{2} \text{ Körnern (Zuwachs von Tag 5 auf Tag 6)} + 0,1 \% \text{ mit } \frac{87}{4} \text{ Körnern (Zuwachs von Tag 6 auf Tag 7)} = 0,4 \% \text{ mit } 60 \text{ Körnern (Endwert am Tag 7)}.$$

Die Einbeziehung der DKZ in diese Berechnung setzt voraus, daß in dieser Zeit kein nennenswerter Verlust hochmarkierter Zellen durch Radiotoxizität erfolgt.

Dafür spricht der gleichbleibende Anstieg des MI und die Tatsache, daß in der Abfallphase die hochmarkierten Zellen nicht wesentlich rascher verschwinden als die niedrigmarkierten.

In der frühen Abfallphase nimmt der MI mit einer $T_{1/2}$ von etwa 11 Tagen ab, woraus auf das Vorhandensein einer relativ kurzlebigen Population geschlossen werden kann.

Nach Verschwinden der kurzlebigen Population deutet sich bis zum Ende der Beobachtungszeit von 30 Tagen eine Indexkonstanz bei 0,2 % an. Daraus kann man eine Einstromrate langlebiger Lymphozyten von 0,04 % / Tag ableiten.

Entsprechend bleibt für die kurzlebigen ein Einstrom von 0,03 % / Tag. Aus dieser sehr niedrigen Einstromrate errechnet sich im vorliegenden Fall eine ungewöhnlich kleine Fraktion kurzlebiger Lymphozyten von 0,5 %.

Bei C11.8 (Abb. 9/10) werden die Anteile der kurz- und langlebigen Lymphozyten an der Gesamtpopulation wiederum nach bekannter Formel ermittelt.

Es resultieren aus der gegebenen Anstiegsrate und den beiden Halbwertszeiten relative Einstromraten für die kurzlebigen von 0,152 % / Tag, für die langlebigen von 0,178 % / Tag.

Aus der durchschnittlichen Verweildauer der kurzlebigen von 18,5 Tagen und der angegebenen relativen Einstromrate errechnet sich der Anteil kurzlebiger mit 2,8 % und entsprechend der der langlebigen Lymphozyten mit 97,2 %.

Die Halbwertszeit der langlebigen Lymphozyten wird hier als Ausdruck der Verdünnung markierter Zellen durch Zustrom unmarkierter Zellen interpretiert. Damit ist deren Halbwertszeit gleich der Verdoppelungszeit der Gesamtpopulation, die einer Akkumulationsrate von 0,183 % / Tag entspricht.

Da der Anteil kurzlebiger Lymphozyten sehr klein ist, kommt die relative Einstromrate langlebiger Lymphozyten der Akkumulationsrate der Gesamtpopulation erwartungsgemäß sehr nahe.

Bei ClI 10 (Abb. 11) zeigt sich eine deutlich verzögerte Ausschwemmung markierter Zellen, aus deren Verlauf sich kein Hinweis auf eine kurzlebige Population ergibt.

Der mittelbare Grund für das langsame Absinken der Indexwerte dürfte die zwischen dem 13. und 48. Tag durchgeführte Milzbestrahlungsserie sein. Innerhalb dieser Zeit nimmt die Blutlymphozytenzahl auf etwa 4 % des Ausgangswertes ab.

Da die Bestrahlung der Milz im wesentlichen ähnlich wirkt wie eine extrakorporale Blutbestrahlung (44) und damit den mit dem Blut kommunizierenden Lymphozytenpool vermindert, ist zunächst keine Änderung des MI zu erwarten.

Mit zunehmender Entleerung des mobilisierbaren Pools kann man davon ausgehen, daß vorher nicht mit den Blutlymphozyten kommunizierende Pools Zugang zum Blut finden.

Der MI des schwer mobilisierbaren Lymphozytenpools dürfte zu diesem Zeitpunkt nach Befunden bei anderen Untersuchungen eher unter dem der Blutlymphozyten liegen.

Gleichzeitig setzt sich der Einstrom an unmarkierten neugebildeten Lymphozyten aus anderen lymphatischen Organen fort.

Insgesamt kommt es auf diese Weise zu einer Verdünnung der Konzentration der ursprünglich im Blut vorhandenen markierten Zellen, d.h. zum Abfall des MI (Abb. 11).

Wird die Vorläuferkompartiment-Transitzeit wiederum mit zwei Tagen angenommen, dann beträgt die effektive Produktionszeit von markierten Zellen 5 Tage. Bezieht man den Maximalwert des MI von 1,0 % auf diese Produktionszeit, dann ergibt sich ein korrigierter Wert für die Anstiegsrate von 0,2 % / Tag.

Unter der Voraussetzung, daß Zellumsatz zu vernachlässigen ist und exponentielles Wachstum vorliegt, entspricht die Anstiegsrate der Akkumulationsrate, aus der sich eine Verdoppelungszeit von 347 Tagen ergibt.

Bei Cll 11 (Abb. 12/13) ist aufgrund des kontinuierlichen Anstiegs und der anschließenden Konstanz der MI-Kurve zu folgern, daß keine nennenswerte Zellelimination vorliegt. Die Tatsache, daß hier eine Indexkonstanz zu registrieren ist, kann durch die mutmaßliche Verminderung der Lymphozytenproduktion und damit der Akkumulation durch die in der vierten Woche einsetzende zytostatische Behandlung erklärt werden.

Wird die Transitzeit im Vorläuferkompartiment wie bei den anderen Patienten mit zwei Tagen angesetzt, so ergibt sich eine für die Produktion markierter Lymphozyten relevante Zeitspanne von $9 \text{ plus } 2 = 11$ Tagen. Bezieht man den Maximalwert des Markierungsindex (2% am Tag 28) auf die angegebene Produktionszeit, dann erhöht sich die Anstiegsrate des Markierungsindex von $0,15 \% / \text{Tag}$ auf $0,19 \% / \text{Tag}$. Der Wert von $0,19 \% / \text{Tag}$ kann der aktuellen Akkumulationsrate gleichgesetzt werden, die einer Verdoppelungszeit von 365 Tagen entsprechen würde.

Wie bei allen Langzeit - markierten Cll-Patienten nimmt auch in diesem Fall die DKZ nicht bis zum Ende des $3\text{H} - \text{TdR} - \text{Angebots}$ zu, sondern erreicht nach vier Tagen ihr Maximum und nimmt danach ab.

Dies läßt sich nicht allein durch Kernkondensation erklären, weil auch die Korndichte gleichzeitig abnimmt (Abb. 13). Letzteres wäre mit einem bevorzugten Verschwinden hochmarkierter Zellen vereinbar, jedoch wird diese Interpretation aus folgenden Gründen für unwahrscheinlich gehalten:

Die Strahlenbelastung markierter Kerne war bei dieser Patientin wesentlich geringer als bei allen anderen untersuchten Fällen. Zudem spricht das minimale Ansprechen auf externe Bestrahlung (Gesamtdosis 450 R) und ein radiomimetisches Zytostatikum (Chlorambucil) für eine hohe Resistenz der Lymphozyten.

Möglicherweise hängt die Abnahme der Korndichte mit der Änderung der $^3\text{H-TdR}$ - Applikationsart (5 Tage kontinuierliche $^3\text{H-TdR}$ - Infusion, vom sechsten Tag an subcutane $^3\text{H-TdR}$ - Injektion in 8 Stunden Abständen) zusammen (15).

3. Höhe der Wachstumsfraktion als prognostisches Kriterium

Tab. II zeigt die relative und absolute Zahl der Lymphozyten, welche bei in-vitro-Inkubation $^3\text{H-TdR}$ aufnehmen (s.S. 11). Diese Thymidin-Inkorporation während einstündiger Inkubation ist als Index für die Anzahl proliferierender Zellen anzusehen (6/33).

Der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellfraktion an der Gesamtlymphozytenzahl bei CLL-Patienten ist sehr klein. Er liegt zwischen 0,02 und 0,05 %.

Da aber, wie in unserer Untersuchung nachgewiesen, leukämische Lymphozyten eine sehr hohe Überlebenszeit haben, akkumuliert die Nachkommenschaft im Laufe der Zeit. So wird, neben einer gleichbleibenden Anzahl proliferierender Zellen, die Masse der nicht an der Zellteilung teilnehmenden Ruhezellen enorm steigen.

Auf diese Weise sinkt der relative Anteil DNS-synthetisierender Lymphozyten, während die Gesamtlymphozytenzahl steigt.

Der absolute Anteil an S-Phase-Zellen ist gegenüber dem Normalen auf ein Vielfaches erhöht (27). Die von uns gefundenen Werte stimmen mit dieser Hypothese überein.

Houshang (27) vergleicht in seiner Arbeit verschiedene Parameter der CLL aus Literaturangaben (5/13/39) unter dem Aspekt ihrer Bedeutung für die Progredienz mit der prognostischen Wichtigkeit des Anteils der S-Phase-Zellen der zirkulierenden Blutlymphozyten. Dieser Anteil erlaubt eine eindeutige Aussage über Schwere und Progredienz der Erkrankung.

Zur Konstanz der Kornvolumina neugebildeter Ruhelymphozyten

Am Beispiel der Patienten Glio 2 (Abb.2) und CLL 11 (Abb.13) soll anhand der Kernflächenkurve auf eine mögliche Kernkondensation bei den markierten Lymphozyten eingegangen werden.

Bei beiden Patienten wurde der Kerndurchmesser der markierten Lymphozyten während der gesamten Beobachtungszeit gemessen und aus den Einzelwerten die durchschnittliche Kernfläche für alle Untersuchungszeitpunkte errechnet.

Es ergab sich, wie die Abbildungen 2 und 13 zeigen, daß die durchschnittliche Kernfläche nach Absetzen der ^3H -TdR-Infusion etwa 3 bis 6 Wochen lang abnimmt. Innerhalb dieser Zeitspanne nähern sich die Kernflächen der markierten Zellen dem Durchschnittswert der jeweiligen Gesamtpopulation. Außerdem wurde beobachtet, daß bei allen Patienten der Markierungsindex der großen Lymphozyten rascher abnahm als der der kleinen.

Dieses Phänomen kann entweder so erklärt werden, daß mehr große als kleine markierte Zellen aus dem Blut verschwinden, oder, daß das Kernvolumen großer markierter Zellen abnimmt (14/35/38/40).

Zur Unterscheidung beider Möglichkeiten kann hier Pat. CLL 11 dienen, bei dem die Absolutzahl markierter Lymphozyten im Blut über 8 Wochen konstant war (Abb.12). Konstanz der Zahl markierter Zellen bei gleichzeitiger Abnahme ihrer durchschnittlichen Kernfläche spricht für einen Übergang großer in kleinere markierte Zellen. Diese Interpretation wird erhärtet durch das Verhalten der DKZ und der Korndichte (Abb. 12/13) und zwar aufgrund folgender Überlegungen:

Bei einer Kernkondensation nimmt bekanntlich die Dichte des Kernes zu (45), die Selbstabsorption pro Volumeneinheit wird größer und die autoradiographisch sichtbare Kornzahl niedriger. Außerdem wird davon ausgegangen, daß bei einer Volumenabnahme eines Kernes dessen Ausbreitungsfähigkeit bei der Ausstrichpräparation abnimmt. Demnach haben im Ausstrich kleine Kerne eine höhere Schichtdicke als große Kerne. Dadurch nimmt der durchschnittliche Abstand der ^3H -Atome zur Filmemulsion zu und die autoradiographische Effizienz ab.

Somit laufen bei einer Kernkondensation zwei Prozesse ab, die beide eine Verminderung der DKZ (Abb. 2 u. 13) bei gleichbleiben-

dem Tritiumgehalt des Kerns bewirken. Dabei verhalten sich offensichtlich DKZ und durchschnittliche Kernfläche etwa proportional, sodaß große und kleine Kerne jeweils gleiche Korndichtewerte aufweisen bzw. bei Umwandlung großer in kleine Kerne die Korndichte konstant bleibt. Dies zeigt anschaulich der Verlauf der drei Kurven bei CLL 11 (Abb. 13).

Es ist anzunehmen, daß auch bei den anderen Patienten, bei denen die Absolutzahl markierter Zellen nach Absetzen der ^3H -TdR-Infusion mehr oder minder rasch abnimmt, markierte große Lymphozyten das morphologische Kompartiment wechseln, wobei die eingangs zuerst genannte Erklärung (bevorzugtes Verschwinden großer markierter Zellen) nicht ausgeschlossen werden kann. Vermutlich laufen beide Mechanismen ab.

Das Phänomen der Kernkondensation von lymphatischen Ruhezellen beeinflusst die zellkinetische Analyse der Markierungskurven in der Abfallphase.

Das beispielsweise für Granulozyten und Monozyten übliche Verfahren der getrennten Betrachtung hoch und niedrig markierter Zellen zur Schätzung der durchschnittlichen Abstromgeschwindigkeit (19) ist nach dem Gesagten bei Lymphozyten unsicherer, weil der Übertritt von höher markierten Zellen in eine niedrigere Kornklasse nicht ausgeschlossen werden kann.

Daher kann die mittlere Verweildauer der Lymphozyten unterschätzt werden, wenn sie anhand der höchstmarkierten ermittelt wird. Das Gegenteil ist der Fall, wenn dieser Parameter aufgrund der niedrig markierten Zellen geschätzt wird.

Strahlenbelastung der Lymphozytenkerne durch ^3H -TdR

Während einige Autoren (11/24/25/32) bei der Markierung mit ^3H -TdR, in der hier verwendeten Dosis, eine Verfälschung der Ergebnisse durch Radiotoxizität als unwahrscheinlich ansehen, so wird doch an anderer Stelle diese Möglichkeit der Zellschädigung beschrieben (23).

Anhand einer Kurvenbetrachtung bei Glio 2 und CLL 11 soll versucht werden, eine mögliche Beeinträchtigung der Ergebnisse, durch Strahlentoxizität des ^3H -TdR zu untersuchen.

Die Höhe der vom Zellkern absorbierten Strahlendosis kann nach einer von Bond und Feinendegen (6/15) angegebenen Formel berechnet werden:

$$\frac{A \times E \times K_1}{m \times K_2} = \text{Rad/Zeiteinheit}$$

Dabei ist A = Zahl der Desintegrationen /Kern/Tag
 E = mittlere Energie eines ^3H -Beta-Teilchens
 K₁ = Faktor
 K₂ = Faktor
 m = Masse/Zellkern in g

Je nach individueller Markierungsintensität beträgt die vom Kern absorbierte Dosis zwischen 0,5 und 9 Rad/Tag.

Bei CLL 11 errechnet sich für den Tag 67 der Untersuchung nach genannter Formel eine Dosis von 2,1 Rad/Tag.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, daß Strahlendosen in diesem Bereich auf Lymphozyten toxisch wirken können (15/23).

Zum Vergleich sei darauf hingewiesen, daß die diskontinuierliche externe Bestrahlung z.B. in Form von Ganzkörperbestrahlung mit 5 bis 25 R/Tag (30) oder in Form einer Milzbestrahlung, wie bei Patient CLL 10, zu einer deutlichen Verminderung der Lymphozytenzahl und zu einer Verkleinerung der Lymphknoten geführt hat. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Tritium-induzierte Strahlenbelastung, bei hoher Dosierung, einen ähnlichen Grad der Zelltoxizität bewirkt wie eine externe Strahlentherapie.

Wie die Abbildungen 2 und 13 zeigen, vermindert sich die Absolutzahl markierter Zellen nach Erreichen eines Maximalwertes kurz nach Ende der ^3H -TdR-Infusion bis zum Abschluß der Beobachtungsperiode, d.h. über 8 bis 9 Wochen. Gleichzeitig, d.h. auch in der Spätphase, nimmt die durchschnittliche Körnchenzahl (DKZ) ab.

Möglicherweise kommen für diesen Markierungsverlust radiobiologische Effekte in Frage. D.h., ein Teil der neugebildeten Lymphozyten, vermutlich solche mit hoher D N S - spezifischer Aktivität, wäre letaltoxisch geschädigt.

Die vorzeitige Elimination dieser Zellen könnte eine Abnahme der DKZ und der durchschnittlichen Korndichte (Abb. 13) bewirkt haben.

Die Halbwertszeit, zumindest für hochmarkierte Lymphozyten wird unterschätzt. Bei der Kurven-Diskussion wird dies berücksichtigt indem wir die Lebenszeit der Lymphozyten anhand der schwach markierten Zellen schätzen, wo radiotoxische Einflüsse am wenigsten zu erwarten sind.

Tabelle III Zusammenstellung umsatzkinetischer Daten

Patient	Anstiegs- rate der Gesamt-Ly (%/die)	langl. kurzl.	absolute Neubil- dungsrate Gesamt (/ul/d)	langl. kurzl.	T/2 langl. kurzl. (Tage)	Umsatz- zeit =Verweil zeit (Tage)	Prozen- tualer Anteil langl. kurzl.	Lympho- zyten (/ul Blut)	S-Phase zellen relativ absolut
Gllo 2	1 %/d	0,118%/d 0,882%/d	23 3	20 3	420 6	1020 8,7Tg	92,3% 7,7%	2310	0,13% 3
Gllo 1	3 %/d	0,95%/d 2,05%/d	70 23	47 23	320 5,8 2,8	749 8,3 4	85 % 15 %	2343	0,25% 6
CLL 2	0,95 %/d	0,05%/d 0,9 %/d	155 8	147 8	1200 5,8 3,4	1750 8,4 4,9	92,5% 7,5%	16300	0,03% 5
CLL 7	0,07 %/d	0,04%/d 0,03%/d	230 132	99 99	1720 11	2500 16	99,5 0,5	300000	0,04% 118
CLL 8	0,33 %/d	0,178%/d 0,152%/d	1170 630	540 540	379 12,8	540 18,5	97,2 2,8	350000	0,02% 70
CLL 10	0,2 %/d	0,2 %/d 0	1060 0		228	330	100 %	530000	0,03% 159
CLL 11	0,19%/d	0,19%/d 0	1900 0				100 % 0	1000000	0,05% 500

In Tab. III sind die Cll-Patienten nach ihrem klinischen Zustandsbild und der Höhe ihrer Lymphozytenzahl aufgeführt und die Ergebnisse der Kurveninterpretation den Werten der Gliom-Patienten gegenübergestellt.

In Übereinstimmung mit Literaturangaben (6) können wir bei den Patienten mit inoperablem Glioblastom, aber hämatologisch unauffälligen Werten (Glio 1/2), normale umsatzkinetische Daten feststellen.

Die Produktionsraten der Lymphozyten sind nach Beendigung der ^3H -TdR-Zufuhr am Markierungsindex abzulesen. Es ergeben sich bei Glio 1 und Glio 2 Neubildungsraten von 1 bzw. 3 % pro Tag, wobei die kurzlebigen anteilmäßig überwiegen.

Die r e l a t i v e Einstromrate der täglich neugebildeten Lymphozyten ist bei Cll-Patienten niedriger als beim Gesunden.

Die a b s o l u t e tägliche Neuproduktion dagegen um ein Vielfaches höher.

Wir sehen z.B. bei Cll 10 einen Zustrom von 1060 Ly/ μl /d gegenüber 23 Ly/ μl /d bei Glio 2. Allerdings kommt es mit zunehmender Schwere der Erkrankung zu einem Überwiegen der langlebigen Lymphozyten. Bei Cll 10 und Cll 11 läßt sich ein kurzlebiger Anteil nicht mehr nachweisen.

Ein entscheidendes Kriterium zur Unterscheidung von Normalität und Pathogenität in der Lymphozytenkinetik ist die Halbwertszeit der Absterberate der Lymphozyten bzw. deren Austreten aus der Blutbahn.

Die Mehrzahl der kurzlebigen Zellen verläßt bei unseren Normalpatienten die Blutbahn mit einer $T/2$ von 2,8 bzw. 6 Tagen. Bei den Cll-Patienten sehen wir Halbwertszeiten der kurzlebigen Lymphozyten zwischen 3,4 und 12,8 Tagen.

Die langlebigen Lymphozyten verlassen bei den Normalpatienten die Blutbahn mit Halbwertszeiten von 320 bzw. 420 Tagen. Bei den Cll-Patienten messen wir Halbwertszeiten bis zu 1720 Tagen. Daraus ergeben sich die entsprechenden Umsatzzeiten.

Zurückgehend zum Ausgangspunkt unserer Überlegungen, der Frage nach der Ursache der abnormen Lymphozytenansammlung im Blut bei der chronisch lymphatischen Leukämie, zeigt sich, in Übereinstimmung mit der Hypothese von Galton und Dameshek (21/13), folgendes

pathophysiologische Bild:

Eine auf das Vielfache gesteigerte Produktion langlebiger und kurzlebiger Lymphozyten -

Akkumulation langlebiger Lymphozyten -

Erhöhung der Absolutzahl proliferierender Lymphozyten in Korrelation mit der Schwere der Erkrankung.

Dabei ist es allerdings ein Charakteristikum aller menschlichen Geschwülste, und damit auch der lymphatischen Systemerkrankung, daß sich nicht alle Zellen an der Proliferation beteiligen (31). Dies erklärt, warum die Lymphozytenpopulationen keineswegs so schnell wachsen, wie zu erwarten wäre, wenn alle proliferierenden Zellen mit konstanter Generationszeit weiterproliferieren würden. Nach Iversen (29) wird die Tatsache, daß die Lymphomzellpopulationen langsamer wachsen als es ihrem Proliferationspotential entspricht, so gedeutet, daß proliferierende Zellen absterben, oder daß sie in einen Ruhezustand (G_0 - Phase) übergehen (29/42/50). Dies führt in beiden Fällen zu einer relativen Verminderung der Wachstumsfraktion (s. Tab. III).

Aufgrund unserer Untersuchungen läßt sich nachweisen, daß Patienten, die in ihren umsatzkinetischen Parametern, sowie in ihren klinischen und laborchemischen Daten am stärksten von der Norm abweichen, die schlechtere Überlebenserwartung haben. Dies wurde bereits in Untersuchungen von Boggs et al (5) und Rai (39) beschrieben.

Aus umsatzkinetischer Sicht sind die Prognosen der Fälle C11 2 / 7 / 8 als relativ günstig zu beurteilen.

Patient C11 10 ist 5 Jahre nach Diagnosestellung,

Patient C11 11 8 Monate nach Diagnosestellung verstorben.

Am Beispiel C11 11 ist der foudroyante Verlauf einer Erkrankung zu beschreiben, die aus völliger Gesundheit heraus innerhalb von 8 Monaten zum Tode führte.

Entsprechend des rapiden klinischen Verlaufes und des schlechten Ansprechens auf die bei C11 übliche Therapie, handelt es sich dabei sehr wahrscheinlich um eine Variante der C11, die Prolymphozytenleukämie. Dafür spricht auch die hohe Zellzahl (1000000) und die Riesenmilz bei relativ wenig vergrößerten Lymphknoten.

Die Prolymphozytenleukämie (PL) ist wesentlich seltener als die klassische Cll und läßt sich von ihr sowohl mit immunologischen, zytochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden, als auch durch den bösartigen Verlauf der Erkrankung unterscheiden (10/21/28).

Die Bedeutung immunologischer Marker in der Differentialdiagnostik lymphatischer Systemerkrankungen wird bei Huber (28) beschrieben.

Während die klassische Cll, wie bei Cll 10 ersichtlich, auf Milzbestrahlung mit Organverkleinerung und Lymphozytenreduktion reagiert, ist das bei Cll 11 nicht der Fall. Auch der bei fortgeschrittener Cll übliche Einsatz von Zytostatika und Corticosteroiden (1) zeigt hier keine therapeutische Wirkung.

Eine eindeutige Abgrenzung der PL von der Cll und anderen Formen der Leukämie ist nötig, zumal bekannt ist, daß dem Patienten mit PL mit der genannten Therapie nicht geholfen werden kann. Zytostatika beeinträchtigen lediglich das noch gesunde Knochenmark, während die leukämische Population gegen diese Behandlung resistent ist (10). Bei Buskard (10) wird die Leukapherese, evt. kombiniert mit Splenektomie, als mögliche Form der Behandlung bei Prolymphozytenleukämie beschrieben.

Die Erkenntnisse in der Zellkinetik durch geeignete Markierungsmethoden sowie Fortschritte in der Immunpathologie lassen hoffen, daß mit zunehmendem Wissen um die lymphatischen Systemerkrankungen die therapeutischen Möglichkeiten entscheidend verbessert werden können.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch intravenöse Gabe von ^3H - Thymidin in Form einer Dauerinfusion über 3 - 9 Tage wurde bei zwei hämatologisch gesunden, bei vier Patienten mit typischer chronisch lymphatischer Leukämie und bei einem Patienten mit mutmaßlicher Prolymphozytenleukämie die Lymphozytenkinetik untersucht.

Die Anwendung von ^3H -TdR über einen definierten Zeitraum erlaubt, im Gegensatz zur einmaligen Applikation, quantitative Schlüsse bezüglich der Lymphozyten-Neubildung, der Verweildauer und der Abstrombewegungen.

Bei einem CLL-Patienten wurde während der umsatzkinetischen Untersuchung eine Milzbestrahlung durchgeführt; bei einem zweiten erfolgte eine Behandlung mit Zytostatika, Corticosteroiden und Milzbestrahlung. Die Wirkung der Therapie auf den Lymphozytenbestand wird beschrieben.

Aus den Markierungsergebnissen wurden die Werte für die tägliche Neubildungsrate, Lebenszeit und Blutverweildauer ermittelt. Durch Analyse der Markierungsintensität ist die Inhomogenität der Lymphozytenpopulation nachzuweisen. Wir können einen Anteil einer Lymphozyten-Population mit relativ kurzer durchschnittlicher Lebensdauer und einer Population mit langer Lebensdauer ermitteln.

Bei den Erkrankungen mit besonders schwerem Verlauf läßt sich eine enorm gesteigerte Produktion an überwiegend langlebigen Lymphozyten feststellen, deren Blutverweildauer deutlich verlängert ist.

Die Untersuchung zeigt an Hand der Patienten mit CLL das Modell einer langsam wachsenden Tumorzell-Population. Langsam wachsend, weil ein großer Teil der Lymphozyten in die Ruhephase geht, d.h., teilweise noch normales Zellverhalten zeigt.

Als eine Sonderform der CLL wird am Beispiel CLL 11 der besonders schwere Verlauf einer Erkrankung beschrieben, die der Prolymphozytenleukämie zuzuordnen ist.

Die klassische Behandlung mit Bestrahlung, Alkylantien und Corticosteroiden bringt hier keinen Erfolg.

Als Parameter für die Schwere der Erkrankung und die Überlebenserwartung des Patienten kann die Absolutzahl proliferierender

Zellen im Blut gelten. Sie ist gleichbedeutend mit der Anzahl ^3H -TdR-inkorporierender Lymphozyten während einstündiger in-vitro-Inkubation.

Der Einfluß einer möglichen Kernkondensation der lymphatischen Ruhezellen im Beobachtungszeitraum auf die Analyse der MI - Kurve in der Abfallphase wird diskutiert.

Eine Schädigung der Lymphozyten durch die verwendete Markierungssubstanz ^3H -TdR in Abhängigkeit von der Dosis ist möglich und muß bei der Kurven-Interpretation berücksichtigt werden.

Die vorliegende Untersuchung untermauert die Theorie, nach der die chronisch lymphatische Leukämie eine Erkrankung des lymphatischen Systems ist, bei der eine vermehrte Produktion und die Akkumulation von Lymphozyten mit abnorm langer Lebensdauer für das Schicksal des Patienten verantwortlich ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 BEGEMANN, H., THEML, H. und FINK, U.: Die Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie. In: Stacher, A. (Hrsg.): Leukämien und maligne Lymphome. München, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg 1973
- 2 H. BEGEMANN, J. RASTETTER, W. KABOTH: Klinische Hämatologie. G. Thieme, Stuttgart 1970.
- 3 BIERMAN, H.R., BYRON, R.L. jr., KELLY, K.H., GILL-FILLAN, R.S., WHITE, L.P., FREEMAN, N.E., and PETRAKIS, N.L.: The characteristics of thoracic duct lymph in man. J. Clin. Invest. 32: 637 - 749 (1953)
- 4 BINET, J.L., LOGEAIS, Y., VILLENEUVE, B., MATHEY, J. et BERNARD, J.: Examen de la lymphe au cours de la leucemie lymphoide chronique. Nouv. Rev. Franc..Hémat. 6: 568 (1966)
- 5 BOGGS DR, SOFFERMAN SA, WINTROBE MM, CARTWRIGHT GE: Factors influencing the duration of survival of patients with chronic lymphocytic leukemia. Am J Med 40:243, 1966
- 6 BOND, V. P., and FEINENDEGEN, L. E.: H^3 thymidine (H^3 TDR) incorporated into DNA; dosimetric considerations. Presented at the IAEA panel on Biophysical Aspects of Radiation Quality, held in Vienna, March 29-April 2, 1965.
- 7 BOND, V.P. et al : Proliverative potentials of bone marrow and blood cells studied by in vitro uptake of 3H -Thymidine. Acta Hämatol. 21: 1, (1959).

- 8 BREMER, K., SCHICK, P., WACK, O., THEML, H., BRASS, B. und HEIMPEL, H.: Rezirkulation von Lymphozyten bei Patienten mit malignen lymphatischen Systemerkrankungen. Blut 24: 215 - 225 (1972)
- 9 BROWN, G., GREAYES, M.F.: Enumeration of absolute numbers of T and B lymphocytes in human blood. Scand. J. Immunol. 3, 161-172 (1974)
- 10 BUSKARD, N.A.: Prolymphozytic Leukämia: Cell Studies and Treatment by Leucapheresis. Hämatologie und Bluttransfusionen, Band 18
- 11 CLARKSON, B., STRIFE, A. FRIED, J., SAKAI, Y., OTA, K., OKKITA, T., MASUDA, R.: Studies of cellular proliferation in human leukemia. Cancer 26, 1, (1970)
- 12 CRONKITE, E.P., T.M. FLIEDNER, V.P. BOND, J.R. RUBINI, G. BRECHER and H. QUASTLER: Dynamics of hemopoietic proliferation in man and mice studied by ³H-Thymidin incorporation into DNA. Ann. N.Y Acad. Sci. 77, 190 (1959).
- 13 DAMASHEK, W.: Chronic lymphocytic leukemia - an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. Blood 29: 566 - 584 (1967)
- 14 EVERETT, N. B., R. W. CAFFREY: Radioautographic studies of bone marrow small lymphocytes. In: YOFFEY, J. M.: The lymphocyte in immunology and haemopoiesis, S. 108-119. Arnold, London 1967.
EVERETT, N. B., R. W. CAFFREY, W. O. RIEKE: Recirculation of lymphocytes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 113 (1964), 887-897.
- 15 FEINENDEGEN, L.E. (1967) Tritium-Labelled Molecules in Biology and Medicine, p. 177. New York and London: Academic Press.
- 16 FEINENDEGEN, L.E., HEINIGER, H.J., FRIEDRICH, G. & CRONKITE,

- E.P. (1973). Differences in reutilization of thymidine in hemopoietic and lymphopoietic tissues of the normal mouse. *Cell Tissue Kinet.* 6, 573-585.
- 17 FLAD, H.D., HUBER.C., BREMER, K., MENNE, H.D.: Impaired recirkulation of B Lymphocytes in chronic lymphocytic leucemia. *Europ. J. Immunol.* 3. 688-693 (1973)
 - 18 FLEMMING, W.: Studien über Regeneration der Gewebe *Arch. mikr. Anat.* 24, 50-91 (1885)
 - 19 FLIEDNER, T. M.: Experimental studies on PHA-Stimulated lymphocytes and autotransfusion of 3H-cytidine labelled lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. In Yoffey, J. M. (Ed.): *The lymphocyte in immunology and haemopoiesis.* London, Edw. Arnold, 1967, p.198.
 - 20 FLIEDNER, T.M., M. KESSE, E.P. CRONKITE, J.S. ROBERTSON: Cell proliferation in germinal center of the rat spleen. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 113 (1964) 578-594.
 - 21 GALTON, D.A.G.: The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Canad. Med. Ass. J.* Vol. 94, 7, 1005-1010 (1966)
 - 22 GOWANS, J.L.: The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J. Physiol.* 146: 54 - 69 (1959)
 - 23 GREENBERG, M.L., CHANANA, A.D., CRONKITE, E.P., SCHIFFER, L.M., and STRYCKMANS, P.A.: Triated thymidine as an cytocidal agent in human leukemia. *Blood* 28: 851 - 859 (1966)
 - 24 HAAS, R.J., BOHNE, F., FLIEDNER, T.M.: Die Wirkung kontinuierlicher intrazellulärer Bestrahlung durch ^3H -Thyminidin auf

schwängere Ratten und auf die Entwicklung ihrer Nachkommen-
schaft.

Strahlentherapie 139, 5, 571-586 (1970)

- 25 HAAS, R.J., FLIEDNER, T.M.: The effect of tritiated thymidine on the oocytes of foetal rats following maternal infusion in pregnancy. Int. J. Radiat. Biol., Vol. 19, No. 2, 197-200, (1971)

- 26 HAMILTON, L.D.: Nucleic acid turnover studies in human leucemic cells and the function of lymphocytes. Nature 178, 597-599 (1956)

- 27 HOUSHANG MOAYERI, M.D.: In Vitro Leukozyte Uptake and Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukämia. The American Journal of Medicine Volume 66 (1979).

- 28 HUBER, Ch., MICHLMAYR, G., HUBER, H., BRAUNSTEINER, H.: Zur Differenzierung von Non-Hodgkin-Lymphomen mit immunologischen, zellkinetischen und physikalischen Methoden. Deutsche Med. Wschr. 102, 1795-1799, 1977.

- 29 IVERSEN, O. H., IVERSEN, U., ZIEGLER, J. L., BLUMING, A.Z.: Cell kinetics in Burkitt Lymphoma. Europ. J. Cancer 10, 155-163 (1975)

- 30 JOHNSON, L.J., LOBUE, J., CHAN, P.C., MONETTE, F.C., RUBIN, A.D., GORDON, A.S., and DAMESHEK, W.: Autoradiographic studies of human lymphocytes cultured in vivo. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130: 675 - 679 (1969)

- 31 KLEIN, H. O., LENNARTZ, K. J., GROSS, R., EDER, M. und FISCHER, R.: In-vivo und In-vitro-Untersuchungen zur Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen. Dtsch. Med. Wschr. 97, 1273-1282 (1972).

- 32 LAJTHA, L.G., OLIVER, R.: The application of autoradiography in the study of nucleic acid metabolism. *Lab. Invest.* 8, 214-224 (1959)
- 33 LOPEZ-SANDOVAL R., et al: In vitro leukocyte thymidine uptake in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 34:146 1974
- 34 MANASTER, J., FRÜHLING, J. and STRYCKMANS, P.: Kinetics of lymphocytes in chronic lymphatic leukemia. I. Equilibrium between blood and a "readily accessible pool". *Blood* 41: 425 - 438 (1973)
- 35 MC GREGOR, D.D.: Effect of tritiated thymidine and 5-bromodeoxyuridine on development of immunologically competent lymphocytes. *Immunology* 16, 83-90 (1969)
- 36 OSGOOD, E. E.: LI, J. G.: TIVEY, H.: DUERST, M. L., and SEAMAN, A. J.: Growth of human leukemic lymphocytes in vitro and in vivo as measured by uptake of P^{32} in desoxyribose nucleic acid. *Science* 114: 95-98, 1951.
- 37 PERRY, S.: Circulation lymphocytaire chez l'homme normal. *Noor. Rev. Franc. Hemat.* 8, 603 (1968).
- 38 POLGAR, P.R., Foster, J.M., Cooperband, S.R.: Glycolysis as an energy source of stimulation of lymphocytes by phytohemagglutinin. *Exp. Cell Res.* 49, 231 (1968).
- 39 RAI, K.R., SAWITZKY, A., CRONKITE, E.P. CHANANA, A.D.: Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, Vol. 46, No. 2 (1975)
- 40 ROBINSON, S. H., G. BRECHER, J. S. LOURIE, J. E. HALEY: Leukocyte labeling in rats during and after continuous infusion of tritiated thymidine: Implications for lymphocyte longevity and DNA reutilization. *Blood* 26 (1965), 281-295.

- 41 RUBINI, J. R., BOND, V. P., KELLER, S., FLIEDNER, T. M. and CRONKITE, E. P.: DNA synthesis in circulating blood leukocytes labelled in vitro with H^3 -thymidine. J. Lab. Clin. Med. 58, 751 (1961).
- 42 SALMON, S. E. SELIGMANN, M.: B-cell neoplasia in man. Lancet 1974 II, 1230-1233
- 43 SCHICK, P.: Lymphocytenkinetik bei lymphatischen Systemerkrankungen (chronische lymphatische Leukämie, Lymphogranulomatose). Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 79 (1973), 154-158. SCHICK, P., F. TREPEL: Unveröffentlichte Befunde.
- 44 SCHICK, P., THEML, H., KABOTH, W., CZEMPIEL, H., BEGEMANN, H., FLIEDNER, T.M., MAILLI, B., ZELLNER, J., BREMER, K. und BOCK, H.: Einflüsse von extrakorporaler Blutbestrahlung und Milzbestrahlung auf in vitro markierte und autotransfundierte Blutlymphozyten von CLL-Patienten. In: Stacher, A. (Hrsg.): Leukämien und maligne Lymphome. München, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg 1973
- 45 SCHICK, P., TREPEL, F., MAISEL, K.H., PAST, W. & BEGEMANN, H. (1978). Labelling of human resting lymphocytes by continuous infusion of 3H -thymidine. II. An analysis of the so-called nuclear label. (Submitted for publication.)
- 46 SMITH, H., MURRAY, D., and GÖKCEN, M.: Life cycle of lymphoid cells in vitro. Europ. J. Cancer 6: 269 - 271 (1970)
- 47 SPIVAK, J.L. and SEYMOUR, P.: Lymphocyte kinetics in chronic lymphocytic leukemia. British Journal of Haematologie, Vol. 18, No. 5, (1970)
- 48 SPRENT, J., MILLER, J.F.A.P.: Interaction of thymus lymphocytes with histoincompatible cells. II. Recirculating lymphocytes derived from antigen-activated

thymus cells. Cell. Immunol. 3, 385 (1972).

- 49 F. TREPEL, H. THEML, P. SCHICK, G. SCHNEBLE, K. BREMER, T.M. FLIEDNER und H. BEGEMANN: Kontinuierliche ^3H -Thymidin-infusion bei CLL: II. Proliferation der Lymphknotenzellen. In: Leukämie, Ed: R. Gross, J. van de Loo, Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1972, pp. 187-191.
- 50 TREPEL, F.: Das lymphatische Zellsystem. Struktur, allgemeine Physiologie und allgemeine Bathophysiologie In: Handbuch der Inneren Medizin II/3: Leukozytäres und retikulozytäres System I (Ed. Begemann, H.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, (1976).
- 51 ZIMMERMANN, Th., GODWIN, H.A., SEYMOUR, P.: Studies of leukocyte kinetics in chronic lymphocytic leukemia. Blood 31, 227-291 (1968)

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Begemann, danke ich für die Überlassung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, die Einrichtungen des Hämatologischen Labors seiner Klinik zu benutzen.

Bei der Durchführung leistete mir Herr Dr.med. P. Schick Beistand. Durch seine Hilfe wurde mir die Einarbeitung in die Thematik erleichtert.

Für die Mithilfe bei der medizinisch-technischen Durchführung und insbesondere bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate bedanke ich mich bei Frau Dr. J.A. van der Woerd-de Lange und Fräulein Jutta Döhrmann.

LEBENS LAUF

Name:	Walter Past
Geboren:	8. Juli 1942
Geburtsort:	München
Vater:	Georg Past, verstorben 1958
Mutter:	Elisabeth Past, geb. Drescher, verstorben 1977
Schulbildung:	1948 - 1956 8 Klassen Volksschule 1956 - 1959 kaufmännische Berufsschule 1962 - 1963 Wehrdienstzeit 1963 - 1965 Kaufm. Angestellter der Fa. Siemens 1965 - 1968 Münchenkolleg
Prüfungen:	1959 Kaufmannsgehilfenprüfung 1968 Reifeprüfung 1969 Naturwissenschaftliche Vorprüfung 1971 Ärztliche Vorprüfung 1974 Ärztliche Prüfung an der Universität München 1975 Eheschließung
Berufliche Tätigkeiten:	1975 - 1976 Medizinalassistent für Chirurgie im Knappschafts Krankenhaus Peißenberg, für Kinderheilkunde im Krankenhaus München-Schwabing, für Innere Medizin im Krankenhaus München-Schwabing 1976 - 1979 Assistenzarzt der I. Med. Abteilung im Krankenhaus München Schwabing 1979 - 1980 Assistenzarzt für Gynäkologie und Geburtshilfe in der Frauenklinik vom Roten Kreuz Vertretungen in Landpraxen

